УДК 615.28

ГИСТОНОВЫЕ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ КАК НОВАЯ МИШЕНЬ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ВОРИНОСТАТА

© 2023 В.П. Максимова^{1#}, Ю.В. Макусь^{1,2#}, В.Г. Попова^{1,3}, А.Ю. Прус^{1,4}, О.Г. Усалка^{1,5}, Е.С. Трапезникова⁵, Е.М. Жидкова¹, Г.А. Белицкий¹, М.Г. Якубовская¹, К.И. Кирсанов^{1,2*}

 ¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478 Москва, Россия; электронная почта: kkirsanov85@yandex.ru
 ² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198 Москва, Россия
 ³ ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», 125047 Москва, Россия

⁴ *ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет», 119571 Москва, Россия* ⁵ *ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им И.М. Сеченова» Минздрава России, 119991 Москва, Россия*

> Поступила в редакцию 02.02.2023 После доработки 13.04.2023 Принята к публикации 20.04.2023

Характерными изменениями в системе эпигенетической регуляции экспрессии генов, сопровождающими процесс злокачественной трансформации клетки, являются аберрантное метилирование и ацетилирование гистонов. Активно используемым в клинической онкологической практике эпигенетически активным препаратом является вориностат, противоопухолевый эффект которого, как правило, связывают с ингибированием гистоновых деацетилаз. Эффекты этого препарата на метилирование гистонов изучены недостаточно. Используя тест-систему HeLa TI, позволяющую оценить интегральный эффект эпигенетически активных соединений по активации экспрессии репортерного гена GFP, и нокдаун генов интерферирующими РНК, мы показали, что ингибирующее действие вориностата направлено не только на HDAC1, но и на SUV39H1, SUV39H2, SUV420H1, EZH2. С помощью Вестерн-блоттинга была подтверждена способность вориностата подавлять экспрессию ферментов SUV39H1/2, SUV420H1, EZH2 и, кроме того, было впервые выявлено его ингибирующее действие на экспрессию ферментов SUV420H2 и DOT1L. Полученные данные расширяют представление об эпигенетических эффектах вориностата и демонстрируют необходимость масштабного анализа его активности в отношении других эпигенетических ферментов. Детальное понимание механизма эпигенетического действия вориностата будет способствовать его более адекватному использованию в терапии опухолей с аберрантным эпигенетическим профилем.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ЗНО с аберрантным эпигенетическим профилем, вориностат, SAHA, метилирование гистонов, гистоновые метилтрансферазы (HMT), тест-система HeLa TI, SUV39H1, SUV39H2, EZH2, SUV420H1, SUV420H2, DOT1L.

DOI: 10.31857/S0320972523070096, EDN: FXUMTH

введение

Необратимый процесс опухолевой трансформации клеток обусловлен генетическими повреждениями ДНК, приводящими к точечным мутациям генов, амплификации генов и хромосомным транслокациям. При этом опухолевая трансформация сопровождается обширным перепрограммированием транскриптома, которое происходит за счет изменения паттерна

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

Принятые сокращения: Б/т – нетрансфицированные клетки; ЗНО – злокачественные новообразования; 5-ага – 5-азацидин; CBL0137 – кураксин CBL0137; DNMT – ДНК-метилтрансферазы; G9a, GLP, SUV39H1, SUV39H2 – гистоновые метилтрансферазы класса КМТ1; DOT1L – гистоновая метилтрансфераза класса КМТ4; EZH2 – гистоновая метилтрансфераза класса КМТ6; HDAC – гистоновые деацетилазы; HeLa TI – популяция клеток HeLa Трихостатин А-Индуцируемая; HMT – гистоновые метилтрансферазы; KMT – лизиновые метилтрансферазы; me – метильная группа; SAHA – вориностат (субероиланилид гидроксамовой кислоты); SUV420H1, SUV420H2 – гистоновые метилтрансферазы класса KMT5; TSA – трихостатин А.

эпигенетических модификаций, в том числе метилирования гистонов [1]. Метилирование гистонов является одним из ключевых эпигенетических механизмов регуляции транскрипции и играет важную роль в таких процессах, как репликация ДНК, репарация и рекомбинация ДНК, транскрипция генов, развитие клеточного цикла и пространственная организация хромосом [2-4]. В основном метильные (me) модификации располагаются на аминокислотных остатках лизина и аргинина *N*-концевых хвостов гистонов H3 и Н4 и подразделяются на метки, активирующие транскрипцию (H3K4me2/3, H3K36me2/3, H3K79me1/2/3) [3, 5, 6] и ответственные за подавление экспрессии генов (Н3К9me2/3, H4K20me3, H3K27me3) [7–9]. Сочетание различных гистоновых модификаций играет ключевую роль для образования эухроматина и гетерохроматина [10]. Процесс катализа метилирования и деметилирования гистонов осуществляют ферменты антагонисты - гистоновые метилтрансферазы (НМТ) и деметилазы, которые функционируют в сложных белковых комплексах, состоящих из различных хроматин-модифицирующих ферментов, транскрипционных факторов или белков-репрессоров транскрипции [11, 12]. Формирование аберрантного профиля метилирования гистонов является результатом структурных нарушений в генах метилтрансфераз и деметилаз, а также результатом некорректной экспрессии данных ферментов в результате внешних воздействий и/или опосредованного влияния генетических нарушений, вызвавших необратимую трансформацию клетки [13]. Гиперэкспрессия и мутации НМТ наблюдаются при различных типах злокачественных новообразований (ЗНО), поскольку изменения в структуре хроматина могут влиять на сигнальные пути и паттерны экспрессии генов, которые способствуют онкогенезу [14].

Наиболее часто вовлеченными в процесс канцерогенеза являются метилтрансферазы EZH1/2, SETDB1, SUV39H1, SUV420H1/2, G9a, GLP, DOT1L, PRMT5, PRMT6, сверхэкспрессия которых наблюдается и часто коррелирует с худшим прогнозом при таких ЗНО, как рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичников, легких, шейки матки, кожи и др. [9, 15–28]. Таким образом, данные ферменты являются перспективными мишенями для противоопухолевой терапии. В настоящее время идет активный поиск и исследование низкомолекулярных соединений, способных модулировать активность HMT. Ряд модуляторов, таких как Chaetocin (ингибитор SUV39H1/H2), UNC0642 и BIX01294 (ингибиторы G9a/GLP), находятся на стадии доклинических испытаний [29–32]. В свою очередь, агенты Pinometostat (ингибитор DOT1L), SHR2554 (ингибитор EZH2), PRT543 (ингибитор PRMT5) и EZM8266 (ингибитор G9a) проходят клинические испытания для терапии пациентов с опухолями кроветворной системы, а также солидными 3HO [33–35]. В 2020 г. для противоопухолевой терапии был одобрен первый ингибитор HMT – таземетостат, действие которого направлено на подавление ферментативной активности EZH2 [36].

Вориностат, также известный как SAHA или Золинза®, является ингибитором гистоновых деацетилаз (HDAC) классов I, II и IV [37]. Данный препарат применяется для лечения пациентов с прогрессирующей, рецидивирующей или устойчивой к химиотерапии кожной Т-клеточной лимфомой [38]. Механизм действия вориностата заключается в связывании иона цинка, находящегося в активном центре HDAC, в результате чего происходит ингибирование каталитической активности фермента. Следствием ингибирования HDAC является повышение ацетилирования гистонов и активация транскрипции [37]. В результате действия вориностата возрастает ацетилирование не только гистоновых белков, но и ряда негистоновых факторов транскрипции, а также белков, участвующих в регуляции клеточной пролиферации, миграции и гибели клетки [39]. Обширные исследования in vitro и in vivo на различных моделях опухолей демонстрируют сильные противоопухолевые эффекты вориностата, включая индукцию ареста клеточного цикла, апоптоза и аутофагии, в том числе в клетках с развившейся химиорезистентностью [40]. В настоящее время накоплен ряд данных клинических испытаний (фазы I и II) о положительном эффекте вориностата в комбинированной терапии таких заболеваний, как множественная миелома, колоректальная карцинома, саркома, миелодиспластический синдром, нейробластома [41-45].

Данные опубликованных исследований свидетельствуют о том, что ингибирование HDAC не является единственным механизмом действия вориностата на систему эпигенетической регуляции транскрипции. Было показано, что ингибиторы HDAC, в том числе вориностат, способствуют увеличению степени метилирования гистона 3 по лизину 4 (H3K4me1/2/3) за счет miRNA-опосредованного подавления экспрессии лизиновых деметилаз семейства JARID1 – RBP2, PLU-1, SMCX и LSD1, относящейся к семейству KDM1 [46]. Также продемонстрирована способность вориностата ингибировать экспрессию ДНК-метилтрансфераз DNMT1 и DNMT3b как на уровне мРНК, так и на уровне белка [47]. Кроме того, в нескольких исследованиях было показано, что вориностат вызывает небольшое, но статистически значимое снижение уровня модификаций H3K9me3 и H3K9me2 [46, 47]. Также было продемонстрировано локус-специфическое влияние вориностата на гистоновые метилтрансферазы SUV39H1 и EZH2 [48, 49]. Несмотря на это, детального изучения интегрального влияния вориностата на метилирование гистонов и на опосредующие его HMT не проводили.

Представленное исследование было направлено на анализ влияния вориностата на процесс метилирования гистонов на интегральном уровне. В качестве модельной системы в работе была использована популяция клеток HeLa TI, несущих в своем геноме эпигенетически репрессированный репортерный ген GFP, кодирующий зеленый флуоресцентный белок. Активация экспрессии GFP происходит при запуске 15 различных эпигенетических факторов снятия репрессии генов, в том числе генов белков, регулирующих ацетилирование и метилирование гистонов [50]. Нокдаун генов определенных эпигенетических ферментов в клетках HeLa TI позволяет оценить вклад кодируемых ими белков в эпигенетическую регуляцию транскрипции. В качестве альтернативного подхода, позволяющего провести более широкое исследование в связи с меньшей трудоемкостью и затратностью, для анализа эффектов эпигенетических препаратов использовали определение содержания ферментов с помощью Вестерн-блоттинга. Конкретные задачи работы включали: (1) провести моделирование эффектов ингибиторов с различным действием на гистоновые деацетилазы при нокдауне гена HDAC1 в тест-системе HeLa TI для дальнейшего определения характера эпигенетичечкого действия вориностата; (2) провести анализ изменений экспрессии репортерного гена GFP при действии вориностата на клетках HeLa TI с нокдауном генов HDAC1, EZH2, SUV39H1, SUV39H2 и SUV420H1; (3) оценить эффекты вориностата на экспрессию гистоновых метилтрансdepa3 EZH2, SUV39H1, SUV39H2, SUV420H1, SUV420H2, G9a, GLP, DOT1L.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. В исследовании использовали клетки HeLa TI – популяцию

БИОХИМИЯ том 88 вып. 7 2023

клеток HeLa, содержащих эпигенетически репрессированный вектор на основе вируса саркомы птиц, кодирующий репортерный ген GFP. Популяция HeLa TI была получена в 2008 г. лабораторией А.М. Скалка (Anna Marie Skalka) и Р. Катца (Richard Katz) из Онкологического центра Фокса Чейза (Fox Chase Cancer Center, Филадельфия, США) [50]. В 2011 г. в рамках выполнения общего проекта клеточная популяция HeLa TI была предоставлена в распоряжение отдела химического канцерогенеза НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. В 2021 г. в нашей лаборатории была завершена верификация возможности использования клеток HeLa TI в качестве тестсистемы для анализа эпигенетической активности ксенобиотиков [51].

Клетки культивировали во флаконах Т-75 («Еррепdorf», Германия) в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), содержащей 4,5 г/литр глюкозы («ПанЭко», Россия), 10% (*v/v*) термически инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; «Віоsега», Франция), смесь антибиотиков пенициллина (50 ед./мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) («Пан-Эко») и 2 мМ L-глутамина («ПанЭко»). Культивирование проводили в стандартных условиях (37 °C, 5% CO₂).

Анализ характера эпигенетического действия вориностата в тест-системе HeLa TI. Анализ реактивации эпигенетически репрессированного гена GFP при совместном действии нокдауна гена HDAC1 и эпигенетических модуляторов трихостатина А, 5-азацитидина и кураксина CBL0137 в тест-системе HeLa TI. Трихостатин A (TSA; «Selleckchem», США), 5-азацидин (5-аzа; «Merck», Германия) и кураксин CBL0137 (CBL0137; «Инкурон», Россия) растворяли в 100%-ном диметилсульфоксиде (ДМСО, «ПанЭко»), стоковая концентрация растворов составила 10 мМ. Клетки HeLa TI высеивали в 24-луночный планшет («Eppendorf») по 20 000 клеток в лунку и через 10 ч проводили трансфекцию 5 нМ siRNA (малые интерферирующие РНК) к мРНК гена HDAC1 (GS3065). Для нокдауна использовали набор из 4 siRNA («Qiagen», Германия). Трансфекцию осуществляли с помощью реактива HiPerFect Transfection Reagent («Qiagen») по протоколу производителя. Концентрации siRNA были выбраны по рекомендации производителя и составляли концентрации, при которых происходит практически полная (не менее 80%) репрессия транскрипции генамишени. Нокдаун от неспецифических эффектов дифференцировали с помощью набоpa siRNA AllStars Negative Control («Qiagen»), который представляет собой несколько siRNA к мРНК генов, не имеющих гомологии ни с одним известным геном млекопитающих. Подтверждение селективного действия siRNA к гену-мишени было осуществлено с помощью метода Вестерн-блоттинг и ПЦР в реальном времени (данные не приводятся). Количество жизнеспособных клеток после нокдауна составляло не менее 80% от общего количества клеток. На следующий день (через 24 ч после трансфекции) клетки обрабатывали нетоксичными концентрациями TSA (0,12 мкМ), 5-ага (10 мкМ), CBL0137 (0,6 мкМ) и инкубировали в течение 24 ч. Конечная концентрация ДМСО в среде с клетками не превышала 0,1%. Затем проводили замену среды на свежую и через 48 ч клетки снимали с подложки с помощью 0,25% (v/v) раствора трипсин-ЭДТА («ПанЭко»), промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) с последующим центрифугированием (250 g, 5 мин) и проводили проточную цитометрию с помощью прибора BD FACSCanto II («BD Biosciences», Бельгия). Для поддержания высокой жизнеспособности клеток при хранении клеточной суспензии был использован раствор PBS с 2%-ной FBS. В ходе анализа использовали синий лазер (488 нм) и канал FITC (530/30 нм).

Анализ реактивации эпигенетически репрессированного гена GFP при действии вориностата и нокдауне генов HDAC1/HMT в тестсистеме HeLa TI. Вориностат («Selleckchem») растворяли в ДМСО, стоковая концентрация составляла 10 мМ. Клетки HeLa TI высевали и проводили трансфекцию siRNA к мPHK генов HDAC1 (GS3065), EZH2 (GS2146), SUV39H1 (GS6839), SUV39H2 (GS79723), SUV420H1 (GS51111), как описано ранее. Для нокдауна каждого из генов использовали набор из 4 siRNA. Концентрации siRNA были выбраны по рекомендациям производителя и составляли концентрации, при которых происходит практически полная (не менее 80%) репрессия транскрипции гена-мишени. Нокдаун от неспецифических эффектов дифференцировали с помощью набора siRNA AllStars Negative Control, как описано выше. Количество жизнеспособных клеток после нокдауна составляло не менее 80% от общего количества клеток. Через 24 ч после трансфекции клетки обрабатывали вориностатом (5 мкМ). Данная концентрация вориностата являлась нетоксичной для клеток при индивидуальном действии агента (жизнеспособность клеток составляла не менее 95% от процента жизнеспособных клеток в анализируемой популяции). Конечное содержание ДМСО при обработке клеток составляло 0,1% (v/v). Через 24 ч после обработки проводили смену среды и через 48 часов осуществляли проточную цитометрию, как описано выше.

Анализ экспрессии гистоновых метилтрансфераз при действии вориностата. Для эксперимента использовали вориностат в концентрации 10 мМ, растворенный в ДМСО. Клетки HeLa TI высеивали в 6-луночные планшеты по 250 000 клеток в лунку и инкубировали с вориностатом (5 мкМ) в течение 24 ч, а также с ДМСО (конечное содержание -0.1% (v/v)) в качестве отрицательного контроля. Для получения общей фракции белка использовали буфер для анализа радиоиммунопреципитации (RIPA): 50 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl (оба – «ПанЭко»), 1% (v/v) Triton X-100 («Ferak», Германия), 0.5% (*w*/*v*) дезоксихолат натрия («Диаэм», Россия), 0,1% (w/v) Ds-Na («Serva», Германия), коктейль ингибиторов протеаз («Roche», Швейцария). Клетки лизировали 1 ч при 4 °С, после чего лизаты центрифугировали (1790 g, 5 мин, 4 °С), отбирали супернатант, содержащий общую фракцию белков, и денатурировали белок в течение 5 мин в буфере для нанесения («Merck», Германия). Количественное определение белка проводили по методу Бредфорда [52]. Разделение белков проводили с помощью вертикального электрофореза в 10%-ном ПААГ в буфере Tris-Gly с Ds-Na (25 мМ Tris, 190 мМ Gly, 10% (w/v) Ds-Na), после чего осуществляли перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США) с размером пор 0,45 мкм (условия переноса для белков 25-100 кДа: 250 мА, 1ч; для белков 100-150 кДа: 100 В, 1 ч). Для исследования использовали кроличьи антитела («Abcam», Великобритания) к гистоновым метилтрансферазам: EZH2 (ab228697; разведение 1 : 7000), SUV39H1 (ab245380; разведение 1:3000),SUV39H2 (ab229493; разведение 1:3000). DOT1L (ab64077; разведение 1:500), G9a (ab183889; разведение 1 : 3000), GLP (ab241306; разведение 1:5000); а также кроличьи антитела («ThermoFisher Scientific», Германия): SUV420H1 (РА5-40926; разведение 1:3000) и SUV420H2 (РА-109891; разведение 1 : 3000).

Для контроля загрузки белка использовали кроличьи антитела к белку β-актин («Abcam»; разведение: 1:10 000). В качестве вторичных антител использовали козьи антитела («Abcam»; разведение: 1:5000), конъюгированные с пероксидазой хрена. Для детекции белков использовали проявляющий реагент Clarity[™] Western ECL Substrate («Bio-Rad») и систему цифровой обработки изображений ImageQuant LAS 4000 («GE Healthcare», США). Оценка белковых полос была проведена с помощью программы ImageJ. Все эксперименты были выполнены в четырех независимых повторах.

Статистический анализ данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8.3.0. Нормальность распределения данных оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Для анализа значимости различий в количестве GFP⁺-клеток при действии агентов TSA, 5-аza, CBL0137 и нокдауне гена *HDAC1* использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с пост-тестом Тьюки для множественных сравнений. Для анализа значимости различий в доле GFP⁺клеток при действии вориностата после нокдауна генов HDAC1, EZH2, SUV39H1, SUV39H2, SUV420H1 использовали двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с пост-тестом Тьюки. Оценку значимости различий уровней экспрессии гистоновых метилтрансфераз после обработки клеток вориностатом проводили с помощью *t*-теста Стьюдента. Пороговый уровень статистической значимости для всех методов составлял p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основной эпигенетический эффект вориностата заключается в неселективном ингибировании HDAC. Наибольшее сродство агент проявляет к ферментам HDAC1, HDAC2, HDAC3 и HDAC6. Вориностат имеет близкие концентрации ингибирования HDAC1, HDAC3 и HDAC6, при этом падение экспрессии более выражено для белка HDAC1 [53, 54].

Тест-система HeLa TI представляет собой популяцию клеток HeLa, несущих эпигенетически репрессированный вектор на основе вируса саркомы птиц, содержащий репортерный ген GFP. Эпигенетическая репрессия гена GFP в клетках HeLa TI обусловлена действием более чем 15 факторов, включающих хроматин-модифицирующие ферменты различных классов, а также гистоновые шапероны [50]. При этом вклад ферментов HDAC в эпигенетическом сайленсинге гена GFP в тест-системе реализуется в основном за счет действия HDAC1 [55]. Ранее было показано, что популяция HeLa TI чувствительна к широкому спектру эпигенетических модуляторов, в том числе ингибиторам HDAC, а также ингибиторам DNMT, HMT и BRD (белки из класса бромодоменов). Кроме того, тест-система может быть использована для анализа синергического эпигенетического эффекта химических соединений: при обработке клеток комбинациями эпимодуляторов с различным механизмом действия происходит увеличение уровня реактивации экспрессии *GFP* относительно индивидуального действия агентов [51]. Основываясь на этих данных, мы предположили, что наличие эпигенетических эффектов вориностата, не сопряженных с ингибированием HDAC, можно будет детектировать в клетках HeLa TI при нокдауне гена *HDAC1*.

На первом этапе исследования было проведено моделирование эффектов ингибиторов с различным действием на гистоновые деацетилазы при нокдауне гена *HDAC1* в тестсистеме HeLa TI для дальнейшего определения характера эпигенетического действия вориностата. Для этого мы оценили уровень реактивации экспрессии гена GFP по количеству GFP⁺-клеток при нокдауне гена *HDAC1* и обработке модуляторами: (1) относящимся к ингибиторам HDAC (трихостатин А), (2) имеющим смешанный механизм действия (кураксин CBL0137) и (3) не влияющим на HDAC (5-азацитидин). Трихостатин А – ингибитор I и II классов HDAC из группы гидроксамовых кислот природного происхождения [56]; 5-азацитидин – нуклеозидный аналог цитидина, деметилирующий ДНК за счет ингибирования DNMT [57]. CBL0137 - низкомолекулярное соединение из группы кураксинов второго поколения, является активатором супрессора опухолей белка р53, а также ингибирует гистоновый шаперон FACT, что приводит к интегральному ремоделированию хроматина и активации транскрипции [58]. Также, по данным Zhou et al. [59], CBL0137 увеличивает уровень ацетилирования гистона Н3 и снижает количество модификаций H3K9me3 и H3K27me3 в промоторах генов интерферонового сигналинга. Было показано, что обработка клеток набором siRNA, не имеющих сродства к генам млекопитающих (siNEG), не приводила к статистически значимому изменению уровня реактивации GFP относительно нетрансфицированных клеток (Б/т) вне зависимости от обработки клеток. Уровень реактивации экспрессии *GFP* в Б/т-клетках составил 4,2%; клетках, обработанных siNEG В - 4.5% (рис. 1, *a*; рис. П1 в Приложении).

Обработка клеток ДМСО, используемого в качестве контроля растворителя, также не приводила к изменению количества GFP⁺клеток по сравнению с необработанными клетками (Б/т-K, siNEG-K). При нокдауне *HDAC1* было зарегистрировано увеличение уровня реактивации экспрессии *GFP* до 43,5%, что превышает значения для необработанных клеток в 10 раз. Обработка клеток TSA



Рис. 1. Реактивация эпигенетически репрессированного гена *GFP* в тест-системе HeLa TI. *a* – При действии эпигенетических модуляторов TSA, 5-ага, CBL0137 и нокдауна *HDAC1. б* – При действии вориностата (SAHA) и нокдауна *HDAC1, EZH2, SUV39H1, SUV39H2, SUV420H1.* Результаты проточной цитометрии (M \pm SD). К – необработанные клетки, отрицательный контроль; Б/т – нетрансфицированные клетки; siNEG – клетки, трансфицированные siRNA, не имеющими гомологии ни с одним известным геном млекопитающих (отрицательный контроль трансфекции); «*» – количество GFP⁺-клеток при действии TSA/5-ага/CBL0137/SAHA или siRNA значимо различается по сравнению с отрицательным контролем (siNEG-K), *p* < 0,01; «#» – количество GFP⁺-клеток при действии TSA/5-ага/ CBL0137/SAHA в группе с нокдауном значимо различается по сравнению с одноименными пробами в группе siNEG, *p* < 0,05; «+» – количество GFP⁺-клеток при действии TSA/5-ага/CBL0137/SAHA значимо различается по сравнению с отрицательным контролем внутри группы siHDAC1/siEZH2/siSUV39H1/siSUV39H2/siSUV420H1, *p* < 0,05

приводила к увеличению количества GFP⁺клеток до 25% для нетрансфицированных клеток (Б/т-TSA) и до 27% — для клеток, обработанных siNEG. В то же время при нокдауне *HDAC1* и последующей обработке TSA уровень реактивации *GFP* составлял около 50%, что соответствовало индивидуальному действию siHDAC. В результате обработки клеток 5-ага происходило увеличение числа GFP⁺-клеток до 14%, а при действии 5-ага и нокдауне *HDAC1* — до 59%, что может говорить о суммировании эффектов ингибирования экспрессии *HDAC1* и DNMT в тест-системе HeLa TI. Кураксин CBL0137 при индивидуальном действии вызывал увеличение уровня реактивации экспрессии *GFP* до 28–30%. После обработки клеток с нокдауном *HDAC1* происходило увеличение числа GFP⁺-клеток до 65,5%, что в 2 раза превышает эффект CBL0137 и практически в 1,5 раза – эффект siHDAC1. Результаты иссле-

БИОХИМИЯ том 88 вып. 7 2023

дования демонстрируют, что при действии агента, не влияющего на HDAC, но влияющего на другие факторы эпигенетической репрессии гена *GFP* в тест-системе HeLa TI (например, 5-аzа), должно происходить суммирование эффектов нокдауна *HDAC1* и модулятора. При наличии перекрестных эффектов модулятора и нокдауна гена *HDAC1* будет наблюдаться частичное или полное перекрытие уровня реактивации *GFP*, как в случае с TSA. При действии эпигенетического модулятора широкого действия, не ограничивающегося влиянием на HDAC, как в случае CBL0137, будет происходить значительное усиление реактивации экспрессии GFP.

На следующем этапе исследования был осуществлен анализ характера эпигенетического действия вориностата в клетках HeLa TI при нокдауне гена *HDAC1*, а также ряда генов метилтрансфераз: EZH2, SUV39H1, SUV39H2, SUV420H1. EZH2 – метилтрансфераза семейства КМТ6, входит в состав репрессивного белкового комплекса PRC2 и опосредует ди- и триметилирование сайта НЗК27, ассоциированного с репрессией транскрипции [13]. Гомологи SUV39H1 и SUV39H2 относятся к классу метилтрансфераз КМТ1 и опосредуют триметилирование сайта H3K9. Белок SUV420H1, наравне со своим гомологом SUV420H2, является ключевым ферментом в триметилировании H4K20me3 и играет важную роль в репликации и репарации ДНК, а также в регуляции клеточного цикла [60]. Образование модификаций H3K9me3 и H4K20me3 способствует запуску механизма метилирования ДНК посредством рекрутирования гетерохроматинового белка HP1 и DNMT, таким образом, способствуя репрессии транскрипции [61, 62]. H3K9me3 и H4K20me3 играют важную роль для образования плотной структуры хроматина в перицентрических и теломерных повторах гетерохроматина, а также участвуют в замалчивании экспрессии генов в эухроматине [63, 64].

Количество GFP⁺-клеток в отрицательном контроле (Б/т-К) составило 3,7%, в контроле трансфекции (siNEG-K) – 3,4% (рис. 1, δ ; рис. П2 в Приложении). Как и ранее, действие siNEG не приводило к изменению профиля реактивации гена *GFP* по сравнению с Б/т-клетками. При действии ДМСО (контроль растворителя) статистически значимого изменения количества GFP⁺-клеток зарегистрировано не было. Нокдаун *HDAC1* вызывал реактивацию экспрессии *GFP* в 45% клеток. Вориностат вызывал реактивацию в 37% клеток (рис. 1, δ). Действие вориностата при нокдауне *HDAC1* приводило к увеличению доли GFP⁺-клеток до 78%, что превышало уровень реактивации как при индивидуальном действии вориностата (в 2,1 раза), так и при нокдауне *HDAC1* (в 1,7 раза). Таким образом, при действии ингибитора HDAC вориностата и нокдауне *HDAC1* в тест-системе HeLa TI происходит увеличение количества GFP⁺-клеток, что свидетельствует о дополнительном HDAC-независимом эпигенетическом эффекте соединения.

Нокдаун генов EZH2, SUV39H1, SUV39H2 и SUV420H1 вызывал значительное увеличение количества GFP⁺-клеток относительно отрицательного контроля: ЕZH2 (48%; 12,9 раза), SUV39H1 (44%; 11,8 pasa), SUV39H2 (34%; 9,1 раза), *SUV420H1* (33%; 8,8 раза) (рис. 1, б). Анализ степени реактивации экспрессии GFP при действии вориностата и нокдауне EZH2 выявил увеличение числа GFP⁺-клеток до 73%, что в 1,5 раза превышает эффект siEZH2 и в 2 раза — эффект вориностата. В то же время при нокдауне SUV39H1 с последующей обработкой вориностатом наблюдалась устойчивая тенденция к росту популяции GFP⁺-клеток относительного индивидуального действия siRNA и агента (в 1,4 и в 1,6 раза соответственно). Обработка клеток вориностатом после нокдауна гена SUV39H2 приводила к реактивации экспрессии GFP в 60% клеток, что в 1,8 раза и 1,6 раза больше, чем при индивидуальном действии siSUV39H2 и вориностата соответственно. Обработка клеток вориностатом при нокдауне SUV420H1 вызывала увеличение количества GFP⁺-клеток до 63,2%, что в 1,9 раза больше относительно эффекта siSUV420H1 и в 1,7 раза – относительно эффекта вориностата. Полученные результаты демонстрируют «пересечение» эффектов вориностата и нокдауна генов EZH2, SUV39H2 и SUV420H1, что говорит о потенциальном влиянии вориностата на эти ферменты. Стоит заметить, что нокдаун генов SUV39H1, SUV39H2 и SUV420H1 в клетках HeLa TI с последующей обработкой вориностатом вызывал снижение процента жизнеспособных клеток до 65%. Высокая токсичность может быть объяснена тем, что метилтрансферазы SUV39H1, SUV39H2 и SUV420H1 являются ключевыми ферментами, катализирующими модификации H3K9me3 и H4K20me3, которые играют ключевую роль в организации структуры хромосом и потеря которых может быть критична даже при краткосрочном действии siRNA [65].

Полученные на модельной системе HeLa TI данные свидетельствовали о том, что вориностат способен неселективно ингибировать экспрессию целого ряда гистоновых метилтрансфераз. В связи с этим на заключительном этапе исследования была поставлена задача



Рис. 2. Уровень экспрессии гистоновых метилтрансфераз при действии вориностата (SAHA). Результаты и денситометрический анализ Вестерн-блоттинга (M \pm SD). К – отрицательный контроль; «*» – различия статистически значимы относительно отрицательного контроля; p < 0.05

с использованием альтернативного подхода, а именно Вестерн-блоттинга, оценить влияние вориностата на уровень содержания не только ферментов, для которых был продемонстрирован эффект на модельной системе HeLa TI, но и ряда других метилтрансфераз гистонов, вовлеченных в прогрессию ЗНО. Таким образом, в перечень исследуемых были добавлены метилтрансферазы SUV420H2, G9a, GLP и DOT1L. Родственные метилтрансферазы G9a и GLP функционируют в составе гетеродимерного комплекса и опосредуют моно- и диметилирование НЗК9, а также индуцируют процесс метилирования ДНК [66]. Белок DOT1L – метилтрансфераза, представляющая класс КМТ4, катализирует моно-, ди- и триметилирование H3K79. DOT1L участвует во многих клеточных процессах, включая геномный импринтинг, ответ на повреждение ДНК, а также процессы более высокого уровня — эритропоэз, дифференцировка клеток, эмбриональное развитие [67]. Сверхэкспрессия DOT1L приводит к активации транскрипции, в том числе теломерных последовательностей [68]. Более того, метилирование H3K79, опосредованное DOT1L, ограничивает рекрутирование репрессивных белков в гетерохроматиновые области [69].

Было продемонстрировано, что при действии вориностата происходит общее снижение экспрессии белка EZH2 в 1,8 раза (рис. 2). Полученные данные хорошо согласуются с результа-

БИОХИМИЯ том 88 вып. 7 2023

тами исследования Nordstrom et al. [49], показавших снижение уровня EZH2 и модификации H3K27me3 в промоторной области гена *SOX11*, кодирующего фактор транскрипции 11, при действии 5 мкМ вориностата. Кроме того, Shi et al. [70] сообщали о высокой чувствительности клеток немелкоклеточного рака легких с высоким уровнем экспрессии EZH2 к обработке вориностатом, а также о положительной корреляции экспрессии ферментов EZH2 и HDAC1.

Также было выявлено, что при действии вориностата происходит значимое снижение количества белков SUV39H1 (в 1,6 раза) и SUV39H2 (в 2,8 раза), ответственных за модификацию H3K9me3 (рис. 2). Наблюдаемый эффект вориностата на метилтрансферазу SUV39H1 согласуется с данными Natarajan et al. [48], которые продемонстрировали на модели рака яичника in vitro снижение экспрессии метилтрансфераз DNMT3A, SUV39H1 и PRMT1 при действии сопоставимой дозы вориностата (7,5 мкМ). Для белков GLP и G9a, входящих в комплекс, опосредующий диметилирование НЗК9, не было зарегистрировано статистически значимого изменения уровня экспрессии. Однако при этом наблюдалась тенденция к снижению количества G9a (в 1,4 раза). Нами также было показано, что вориностат вызывает снижение экспрессии метилтрансфераз SUV420H1 и SUV420H2, опосредующих метилирование репрессивной метки H4K20me3, в 1,3 и 1,5 раза соответственно. Выявленное влияние вориностата на данные белки может объяснять его способность вызывать реорганизацию хроматина, что возможно связано с установленным для вориностата генотоксическим действием [71, 72]. Также нами было продемонстрировано, что после обработки клеток вориностатом происходит ингибирование экспрессии (в 2 раза) белка DOT1L, ответственного за метилирование сайта НЗК79. Влияние вориностата на ферменты SUV39H2, SUV420H1, SUV420H2 и DOT1L в опубликованных ранее данных не было описано.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании было показано, что эпигенетические эффекты вориностата, помимо ингибирования HDAC, распространяются и на гистоновые метилтрансферазы. Нами впервые была показана способность вориностата снижать интегральный уровень гистоновых метилтрансфераз SUV39H2, SUV420H1, SUV420H2 и DOT1L, которые гиперэкспрессированы при различных ЗНО. Новые данные о механизме эпигенетического действия вориностата будут способствовать более адекватному использованию данного препарата в противоопухолевой терапии, а также должны способствовать пониманию молекулярных механизмов его побочных эффектов. В совокупности, полученные данные могут послужить механистической базой для расширения области применения вориностата, и, как следствие, увеличения эффективности терапии опухолей с аберрантным эпигенетическим профилем.

Вклад авторов. В.П.М., К.И.К., М.Г.Я. – разработка концепции исследования; К.И.К., М.Г.Я. – руководство исследованием, редактирование текста; В.П.М., Ю.В.М. – написание текста; В.П.М., Ю.В.М., В.Г.П., А.Ю.П., О.Г.У., Е.С.Т., Е.М.Ж. – проведение экспериментов; В.П.М., Ю.В.М., Е.М.Ж. – подготовка иллюстраций; В.П.М., К.И.К., М.Г.Я., Г.А.Б. – обсуждение результатов исследования.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-75-10163).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (https://biochemistrymoscow.com).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Tian, X., Zhang, S., Liu, H. M., Zhang, Y. B., Blair, C. A., Mercola, D., Sassone-Corsi, P., and Zi, X. (2013) Histone lysine-specific methyltransferases and demethylases in carcinogenesis: new targets for cancer therapy and prevention, *Curr. Cancer Drug Targets*, 13, 558-579, doi: 10.2174/1568009611313050007.
- 2. Zhao, S., Allis, C. D., and Wang, G. G. (2021) The language of chromatin modification in human

БИОХИМИЯ том 88 вып. 7 2023

cancers, *Nat. Rev. Cancer*, **21**, 413-430, doi: 10.1038/ s41568-021-00357-x.

- Lam, U. T. F., Tan, B. K. Y., Poh, J. J. X., and Chen, E. S. (2022) Structural and functional specificity of H3K36 methylation, *Epigenetics Chromatin*, 15, 17, doi: 10.1186/s13072-022-00446-7.
- 4. Greer, E. L., and Shi, Y. (2012) Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inher-

itance, Nat. Rev. Genet., 13, 343-357, doi: 10.1038/ nrg3173.

- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C., Schreiber, S. L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3, *Nature*, 419, 407-411, doi: 10.1038/nature01080.
- Farooq, Z., Banday, S., Pandita, T. K., and Altaf, M. (2016) The many faces of histone H3K79 methylation, *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.*, **768**, 46-52, doi: 10.1016/ j.mrrev.2016.03.005.
- Cutter DiPiazza, A. R., Taneja, N., Dhakshnamoorthy, J., Wheeler, D., Holla, S., and Grewal, S. I. S. (2021) Spreading and epigenetic inheritance of heterochromatin require a critical density of histone H3 lysine 9 tri-methylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 118, e2100699118, doi: 10.1073/pnas.2100699118.
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., and Jenuwein, T. (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin, *Genes Dev.*, 18, 1251-1262, doi: 10.1101/gad.300704.
- Padeken, J., Methot, S. P., and Gasser, S. M. (2022) Establishment of H3K9-methylated heterochromatin and its functions in tissue differentiation and maintenance, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 23, 623-640, doi: 10.1038/s41580-022-00483-w.
- Murakami, Y. (2013) Heterochromatin and Euchromatin, in *Encyclopedia of Systems Biology* (Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Cho, K.-H., and Yokota, H. eds) Springer New York, New York, NY, pp. 881-884, doi: 10.1007/978-1-4419-9863-7_1413.
- Dimitrova, E., Turberfield, A. H., and Klose, R. J. (2015) Histone demethylases in chromatin biology and beyond, *EMBO Rep.*, 16, 1620-1639, doi: 10.15252/ embr.201541113.
- 12. Taylor-Papadimitriou, J., and Burchell, J. M. (2022) Histone methylases and demethylases regulating antagonistic methyl marks: changes occurring in cancer, *Cells*, **11**, 1113, doi: 10.3390/cells11071113.
- Chen, Y., Ren, B., Yang, J., Wang, H., Yang, G., Xu, R., You, L., and Zhao, Y. (2020) The role of histone methylation in the development of digestive cancers: a potential direction for cancer management, *Signal. Transduct. Target Ther.*, 5, 143, doi: 10.1038/ s41392-020-00252-1.
- Yang, Y., Zhang, M., and Wang, Y. (2022) The roles of histone modifications in tumorigenesis and associated inhibitors in cancer therapy, *J. Natl. Cancer Center*, 2, 277-290, doi: 10.1016/j.jncc.2022.09.002.
- Lee, S. H., Li, Y., Kim, H., Eum, S., Park, K., and Lee, C. H. (2022) The role of EZH1 and EZH2 in development and cancer, *BMB Rep.*, 55, 595-601, doi: 10.5483/BMBRep.2022.55.12.174.
- Duan, D., Shang, M., Han, Y., Liu, J., Liu, J., Kong, S. H., Hou, J., Huang, B., Lu, J., and Zhang, Y. (2022)

EZH2-CCF-cGAS Axis Promotes Breast Cancer Metastasis, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 1788, doi: 10.3390/ ijms23031788.

- Entezari, M., Taheriazam, A., Paskeh, M. D. A., Sabouni, E., Zandieh, M. A., Aboutalebi, M., Kakavand, A., Rezaei, S., Hejazi, E. S., Saebfar, H., Salimimoghadam, S., Mirzaei, S., Hashemi, M., and Samarghandian, S. (2023) The pharmacological and biological importance of EZH2 signaling in lung cancer, *Biomed. Pharmacother.*, 160, 114313, doi: 10.1016/j.biopha.2023.114313.
- Zakharova, V. V., Magnitov, M. D., Del Maestro, L., Ulianov, S. V., Glentis, A., Uyanik, B., Williart, A., Karpukhina, A., Demidov, O., Joliot, V., Vassetzky, Y. S., Mege, R. M., Piel, M., Razin, S. V., and Ait-Si-Ali, S. (2022) SETDB1 fuels the lung cancer phenotype by modulating epigenome, 3D genome organization and chromatin mechanical properties, *Nucleic Acids Res.*, 50, 4389-4413, doi: 10.1093/nar/gkac234.
- Liu, Z., Liu, J., Ebrahimi, B., Pratap, U. P., He, Y., Altwegg, K. A., Tang, W., Li, X., Lai, Z., Chen, Y., Shen, L., Sareddy, G. R., Viswanadhapalli, S., Tekmal, R. R., Rao, M. K., and Vadlamudi, R. K. (2022) SETDB1 interactions with PELP1 contributes to breast cancer endocrine therapy resistance, *Breast Cancer Res.*, 24, 26, doi: 10.1186/s13058-022-01520-4.
- Zhang, L., Tian, S., Zhao, M., Yang, T., Quan, S., Song, L., and Yang, X. (2021) SUV39H1-mediated DNMT1 is involved in the epigenetic regulation of Smad3 in cervical cancer, *Anticancer Agents Med. Chem.*, 21, 756-765, doi: 10.2174/1871520620666200721110016.
- Saha, N., and Muntean, A. G. (2021) Insight into the multi-faceted role of the SUV family of H3K9 methyltransferases in carcinogenesis and cancer progression, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, 1875, 188498, doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188498.
- Vougiouklakis, T., Sone, K., Saloura, V., Cho, H. S., Suzuki, T., Dohmae, N., Alachkar, H., Nakamura, Y., and Hamamoto, R. (2015) SUV420H1 enhances the phosphorylation and transcription of ERK1 in cancer cells, *Oncotarget*, 6, 43162-43171, doi: 10.18632/oncotarget.6351.
- Moshiri, A., Cheng, H., Kim, S., and Saloura, V. J. (2023) SUV420H1 as a novel target in HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma, *Cancer Res.*, 83, 6284, doi: 10.1158/1538-7445.AM2023-6284.
- Viotti, M., Wilson, C., McCleland, M., Koeppen, H., Haley, B., Jhunjhunwala, S., Klijn, C., Modrusan, Z., Arnott, D., Classon, M., Stephan, J. P., and Mellman, I. (2018) SUV420H2 is an epigenetic regulator of epithelial/mesenchymal states in pancreatic cancer, *J. Cell Biol.*, **217**, 763-777, doi: 10.1083/jcb.201705031.
- Nachiyappan, A., Gupta, N., and Taneja, R. (2022) EHMT1/EHMT2 in EMT, cancer stemness and drug resistance: emerging evidence and mechanisms, *FEBS J.*, 289, 1329-1351, doi: 10.1111/febs.16334.
- Alexandrova, E., Salvati, A., Pecoraro, G., Lamberti, J., Melone, V., Sellitto, A., Rizzo, F., Giurato, G.,

БИОХИМИЯ том 88 вып. 7 2023

Tarallo, R., Nassa, G., and Weisz, A. (2022) Histone methyltransferase DOT1L as a promising epigenetic target for treatment of solid tumors, *Front. Genet.*, **13**, 864612, doi: 10.3389/fgene.2022.864612.

- Wu, Y., Wang, Z., Han, L., Guo, Z., Yan, B., Guo, L., Zhao, H., Wei, M., Hou, N., Ye, J., Wang, Z., Shi, C., Liu, S., Chen, C., Chen, S., Wang, T., Yi, J., Zhou, J., Yao, L., Zhou, W., et al. (2022) PRMT5 regulates RNA m6A demethylation for doxorubicin sensitivity in breast cancer, *Mol. Ther.*, **30**, 2603-2617, doi: 10.1016/ j.ymthe.2022.03.003.
- Chen, Z., Gan, J., Wei, Z., Zhang, M., Du, Y., Xu, C., and Zhao, H. (2022) The emerging role of PRMT6 in cancer, *Front Oncol*, **12**, 841381, doi: 10.3389/fonc.2022.841381.
- Jiang, H., Li, Y., Xiang, X., Tang, Z., Liu, K., Su, Q., Zhang, X., and Li, L. (2021) Chaetocin: A review of its anticancer potentials and mechanisms, *Eur. J. Pharmacol.*, **910**, 174459, doi: 10.1016/ j.ejphar.2021.174459.
- Zhang, S., Guo, J., Zhang, H., Tong, L., and Zhang, L. (2023) Gliotoxin induced ferroptosis by downregulating SUV39H1 expression in esophageal cancer cells, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, 18, 397-407, doi: 10.2174/1574892817666220905114120.
- Rahman, Z., Bazaz, M. R., Devabattula, G., Khan, M. A., and Godugu, C. (2021) Targeting H3K9 methyltransferase G9a and its related molecule GLP as a potential therapeutic strategy for cancer, *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **35**, e22674, doi: 10.1002/jbt.22674.
- Lin, H. Y., Wu, H. J., Chen, S. Y., Hou, M. F., Lin, C. S., and Chu, P. Y. (2022) Epigenetic therapy combination of UNC0638 and CI-994 suppresses breast cancer via epigenetic remodeling of BIRC5 and GADD45A, *Biomed. Pharmacother.*, 145, 112431, doi: 10.1016/j.biopha.2021.112431.
- Rugo, H. S., Jacobs, I., Sharma, S., Scappaticci, F., Paul, T. A., Jensen-Pergakes, K., and Malouf, G. G. (2020) The promise for histone methyltransferase inhibitors for epigenetic therapy in clinical oncology: a narrative review, *Adv. Ther.*, **37**, 3059-3082, doi: 10.1007/s12325-020-01379-x.
- Stein, E. M., Garcia-Manero, G., Rizzieri, D. A., Tibes, R., Berdeja, J. G., Savona, M. R., Jongen-Lavrenic, M., Altman, J. K., Thomson, B., Blakemore, S. J., Daigle, S. R., Waters, N. J., Suttle, A. B., Clawson, A., Pollock, R., Krivtsov, A., Armstrong, S. A., DiMartino, J., Hedrick, E., Lowenberg, B., and Tallman, M. S. (2018) The DOT1L inhibitor pinometostat reduces H3K79 methylation and has modest clinical activity in adult acute leukemia, *Blood*, 131, 2661-2669, doi: 10.1182/blood-2017-12-818948.
- Marzochi, L. L., Cuzziol, C. I., Nascimento Filho, C., Dos Santos, J. A., Castanhole-Nunes, M. M. U., Pavarino, E. C., Guerra, E. N. S., and Goloni-Bertollo, E. M. (2023) Use of histone methyltransferase inhibitors in cancer treatment: a systematic review,
- 11 БИОХИМИЯ том 88 вып. 7 2023

Eur. J. Pharmacol., **944**, 175590, doi: 10.1016/j. ejphar.2023.175590.

- Hoy, S. M. (2020) Tazemetostat: first approval, *Drugs*, 80, 513-521, doi: 10.1007/s40265-020-01288-x.
- Richon, V. M. (2006) Cancer biology: mechanism of antitumour action of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid), a novel histone deacetylase inhibitor, *Br. J. Cancer*, 95, S2-S6, doi: 10.1038/sj.bjc.6603463.
- Siegel, D., Hussein, M., Belani, C., Robert, F., Galanis, E., Richon, V. M., Garcia-Vargas, J., Sanz-Rodriguez, C., and Rizvi, S. (2009) Vorinostat in solid and hematologic malignancies, *J. Hematol. Oncol.*, 2, 31, doi: 10.1186/1756-8722-2-31.
- Singh, B. N., Zhang, G., Hwa, Y. L., Li, J., Dowdy, S. C., and Jiang, S. W. (2010) Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets, *Expert Rev. Anticancer Ther.*, **10**, 935-954, doi: 10.1586/era.10.62.
- Lee, Y. J., Won, A. J., Lee, J., Jung, J. H., Yoon, S., Lee, B. M., and Kim, H. S. (2012) Molecular mechanism of SAHA on regulation of autophagic cell death in tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cells, *Int. J. Med. Sci.*, 9, 881-893, doi: 10.7150/ijms.5011.
- Brown, S., Pawlyn, C., Tillotson, A.-L., Sherratt, D., Flanagan, L., Low, E., Morgan, G. J., Williams, C., Kaiser, M., Davies, F. E., and Jenner, M. W. (2021) Bortezomib, vorinostat, and dexamethasone combination therapy in relapsed myeloma: results of the phase 2 MUK four trial, *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.*, 21, 154-161.e153, doi: 10.1016/j.clml.2020.11.019.
- Bilotti, E., Vesole, D. H., McBride, L., Schmidt, L., Gao, Z., Gilani, M., McNeill, A., Bednarz, U., Richter, J., Mato, A., Graef, T., and Siegel, D. S. (2016) Vorinostat in combination with lenalidomide and dexamethasone in lenalidomide-refractory multiple myeloma, *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.*, 16, 558-562, doi: 10.1016/j.clml.2016.08.001.
- Wang, Y., Janku, F., Piha-Paul, S., Hess, K., Broaddus, R., Liu, L., Shi, N., Overman, M., Kopetz, S., Subbiah, V., Naing, A., Hong, D., Tsimberidou, A. M., Karp, D., Yao, J., and Fu, S. (2020) Phase I studies of vorinostat with ixazomib or pazopanib imply a role of antiangiogenesis-based therapy for TP53 mutant malignancies, *Sci. Rep.*, **10**, 3080, doi: 10.1038/ s41598-020-58366-z.
- 44. Prebet, T., Braun, T., Beyne-Rauzy, O., Dreyfus, F., Stammatoullas, A., Wattel, E., Ame, S., Raffoux, E., Delaunay, J., Charbonnier, A., Ades, L., Fenaux, P., and Vey, N. (2014) Combination of vorinostat and low dose cytarabine for patients with azacitidine-refractory/relapsed high risk myelodysplastic syndromes, *Leuk. Res.*, **38**, 29-33, doi: 10.1016/j.leukres.2013.07.023.
- 45. DuBois, S. G., Granger, M. M., Groshen, S., Tsao-Wei, D., Ji, L., Shamirian, A., Czarnecki, S., Goodarzian, F., Berkovich, R., Shimada, H., Villablanca, J. G., Vo, K. T., Pinto, N., Mosse, Y. P., Maris, J. M., Shusterman, S., Cohn, S. L., Goldsmith, K. C., Weiss, B., Yanik, G. A., Twist, C. J., Irwin, M. S.,

Haas-Kogan, D. A., Park, J. R., Marachelian, A., and Matthay, K. K. (2021) Randomized phase II trial of MIBG versus MIBG, vincristine, and irinotecan versus MIBG and vorinostat for patients with relapsed or refractory neuroblastoma: a report from NANT consortium, *J. Clin. Oncol.*, **39**, 3506-3514, doi: 10.1200/JCO.21.00703.

- 46. Huang, P. H., Chen, C. H., Chou, C. C., Sargeant, A. M., Kulp, S. K., Teng, C. M., Byrd, J. C., and Chen, C. S. (2011) Histone deacetylase inhibitors stimulate histone H3 lysine 4 methylation in part via transcriptional repression of histone H3 lysine 4 demethylases, *Mol. Pharmacol.*, **79**, 197-206, doi: 10.1124/ mol.110.067702.
- 47. Li, C. T., Hsiao, Y. M., Wu, T. C., Lin, Y. W., Yeh, K. T., and Ko, J. L. (2011) Vorinostat, SAHA, represses telomerase activity via epigenetic regulation of telomerase reverse transcriptase in non-small cell lung cancer cells, *J. Cell Biochem.*, **112**, 3044-3053, doi: 10.1002/jcb.23229.
- Natarajan, U., Venkatesan, T., and Rathinavelu, A. (2021) Effect of the HDAC inhibitor on histone acetylation and methyltransferases in A2780 ovarian cancer cells, *Medicina (Kaunas)*, 57, 456, doi: 10.3390/medicina57050456.
- Nordstrom, L., Andersson, E., Kuci, V., Gustavsson, E., Holm, K., Ringner, M., Guldberg, P., and Ek, S. (2015) DNA methylation and histone modifications regulate SOX11 expression in lymphoid and solid cancer cells, *BMC Cancer*, **15**, 273, doi: 10.1186/ s12885-015-1208-y.
- Poleshko, A., Einarson, M. B., Shalginskikh, N., Zhang, R., Adams, P. D., Skalka, A. M., and Katz, R. A. (2010) Identification of a functional network of human epigenetic silencing factors, *J. Biol. Chem.*, 285, 422-433, doi: 10.1074/jbc.M109.064667.
- Maksimova, V., Shalginskikh, N., Vlasova, O., Usalka, O., Beizer, A., Bugaeva, P., Fedorov, D., Lizogub, O., Lesovaya, E., Katz, R., Belitsky, G., Kirsanov, K., and Yakubovskaya, M. (2021) HeLa TI cell-based assay as a new approach to screen for chemicals able to reactivate the expression of epigenetically silenced genes, *PLoS One*, **16**, e0252504, doi: 10.1371/journal. pone.0252504.
- 52. Kruger, N. J. (2009) The Bradford Method For Protein Quantitation, in *The Protein Protocols Handbook* (Walker, J. M., ed.) Humana Press, Totowa, NJ, pp. 17-24, doi: 10.1007/978-1-59745-198-7_4.
- 53. Suzuki, T., Kasuya, Y., Itoh, Y., Ota, Y., Zhan, P., Asamitsu, K., Nakagawa, H., Okamoto, T., and Miyata, N. (2013) Identification of highly selective and potent histone deacetylase 3 inhibitors using click chemistry-based combinatorial fragment assembly, *PLoS One*, 8, e68669, doi: 10.1371/journal.pone.0068669.
- 54. Kurundkar, D., Srivastava, R. K., Chaudhary, S. C., Ballestas, M. E., Kopelovich, L., Elmets, C. A., and Athar, M. (2013) Vorinostat, an HDAC inhibitor

attenuates epidermoid squamous cell carcinoma growth by dampening mTOR signaling pathway in a human xenograft murine model, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **266**, 233-244, doi: 10.1016/j.taap.2012.11.002.

- 55. Poleshko, A., Kossenkov, A. V., Shalginskikh, N., Pecherskaya, A., Einarson, M. B., Skalka, A. M., and Katz, R. A. (2014) Human factors and pathways essential for mediating epigenetic gene silencing, *Epigenetics*, 9, 1280-1289, doi: 10.4161/epi.32088.
- Xiao, W., Chen, X., Liu, X., Luo, L., Ye, S., and Liu, Y. (2014) Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses proliferation and epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelium cells, *J. Cell. Mol. Med.*, 18, 646-655, doi: 10.1111/jcmm.12212.
- Christman, J. K. (2002) 5-Azacytidine and 5-aza-2'deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy, *Oncogene*, **21**, 5483-5495, doi: 10.1038/ sj.onc.1205699.
- Jin, M. Z., Xia, B. R., Xu, Y., and Jin, W. L. (2018) Curaxin CBL0137 exerts anticancer activity via diverse mechanisms, *Front. Oncol.*, 8, 598, doi: 10.3389/ fonc.2018.00598.
- 59. Zhou, D., Park, J. G., Wu, Z., Huang, H., Fiches, G. N., Biswas, A., Li, T. W., Ma, Q., Martinez-Sobrido, L., Santoso, N., and Zhu, J. (2021) FACT subunit SUPT16H associates with BRD4 and contributes to silencing of antiviral interferon signaling, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.04.21.440833.
- 60. Gabellini, D., and Pedrotti, S. (2022) The SUV4-20H histone methyltransferases in health and disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 4736, doi: 10.3390/ijms23094736.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins, *Nature*, 410, 116-120, doi: 10.1038/35065132.
- Ren, W., Fan, H., Grimm, S. A., Kim, J. J., Li, L., Guo, Y., Petell, C. J., Tan, X.-F., Zhang, Z.-M., Coan, J. P., Yin, J., Kim, D. I., Gao, L., Cai, L., Khudaverdyan, N., Çetin, B., Patel, D. J., Wang, Y., Cui, Q., Strahl, B. D., Gozani, Or, Miller, K. M., O'Leary, S. E., Wade, P. A., Wang, G. G., and Song, J. (2021) DNMT1 reads heterochromatic H4K20me3 to reinforce LINE-1 DNA methylation, *Nat. Commun.*, 12, 2490, doi: 10.1038/s41467-021-22665-4.
- 63. Dang-Nguyen, T. Q., Haraguchi, S., Furusawa, T., Somfai, T., Kaneda, M., Watanabe, S., Akagi, S., Kikuchi, K., Tajima, A., and Nagai, T. (2013) Downregulation of histone methyltransferase genes SUV39H1 and SUV39H2 increases telomere length in embryonic stem-like cells and embryonic fibroblasts in pigs, *J. Reprod. Dev.*, **59**, 27-32, doi: 10.1262/jrd.2012-118.
- Abini-Agbomson, S., Gretarsson, K., Shih, R. M., Hsieh, L., Lou, T., Ioannes, P. D., Vasilyev, N., Lee, R., Wang, M., Simon, M., Armache, J.-P., Nudler, E., Narlikar, G., Liu, S., Lu, C., and Armache, K.-J. (2023) Catalytic and non-catalytic mechanisms of

histone H4 lysine 20 methyltransferase SUV420H1, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2023.03.17.533220.

- 65. Nicetto, D., and Zaret, K. S. (2019) Role of H3K9me3 heterochromatin in cell identity establishment and maintenance, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **55**, 1-10, doi: 10.1016/j.gde.2019.04.013.
- Tachibana, M., Matsumura, Y., Fukuda, M., Kimura, H., and Shinkai, Y. (2008) G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription, *EMBO J.*, 27, 2681-2690, doi: 10.1038/emboj.2008.192.
- Shah, S., and Henriksen, M. A. (2011) A novel disrupter of telomere silencing 1-like (DOT1L) interaction is required for signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1)-activated gene expression, *J. Biol. Chem.*, 286, 41195-41204, doi: 10.1074/ jbc.M111.284190.
- Song, Y., Wu, F., and Wu, J. (2016) Targeting histone methylation for cancer therapy: enzymes, inhibitors, biological activity and perspectives, *J. Hematol. Oncol.*, 9, 49, doi: 10.1186/s13045-016-0279-9.
- 69. Pokholok, D. K., Harbison, C. T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N. M., Lee, T. I., Bell, G. W.,

Walker, K., Rolfe, P. A., Herbolsheimer, E., Zeitlinger, J., Lewitter, F., Gifford, D. K., and Young, R. A. (2005) Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast, *Cell*, **122**, 517-527, doi: 10.1016/j.cell.2005.06.026.

- Shi, B., Behrens, C., Vaghani, V., Riquelme, E. M., Rodriguez-Canales, J., Kadara, H., Lin, H., Lee, J., Liu, H., Wistuba, I., and Simon, G. (2019) Oncogenic enhancer of zeste homolog 2 is an actionable target in patients with non-small cell lung cancer, *Cancer Med.*, 8, 6383-6392, doi: 10.1002/cam4.1855.
- Petruccelli, L. A., Dupere-Richer, D., Pettersson, F., Retrouvey, H., Skoulikas, S., and Miller, W. H., Jr. (2011) Vorinostat induces reactive oxygen species and DNA damage in acute myeloid leukemia cells, *PLoS One*, 6, e20987, doi: 10.1371/journal.pone.0020987.
- 72. Attia, S. M., Al-Khalifa, M. K., Al-Hamamah, M. A., Alotaibi, M. R., Attia, M. S. M., Ahmad, S. F., Ansari, M. A., Nadeem, A., and Bakheet, S. A. (2020) Vorinostat is genotoxic and epigenotoxic in the mouse bone marrow cells at the human equivalent doses, *Toxicology*, **441**, 152507, doi: 10.1016/j.tox. 2020.152507.

HISTONE METHYLTRANSFERASES AS A NEW TARGET FOR THE EPIGENETIC ACTION BY VORINOSTAT

V. P. Maksimova^{1#}, J. V. Makus^{1,2#}, V. G. Popova^{1,3}, A. Yu. Prus^{1,4}, O. G. Usalka^{1,5},
E. S. Trapeznikova⁵, E. M. Zhidkova¹, G. A. Belitsky¹,
M. G. Yakubovskaya¹, and K. I. Kirsanov^{1,2*}

¹ National Medical Research Center of Oncology named after N. N. Blokhin, 115478 Moscow, Russia; e-mail: kkirsanov85@yandex.ru

² Peoples' Friendship University of Russia, 117198 Moscow, Russia

³ Russian University of Chemical Technology named after D. I. Mendeleev, 125047 Moscow, Russia

⁴ MIREA – Russian Technological University, 119571 Moscow, Russia

⁵ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University

of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 119991 Moscow, Russia

Aberrant methylation and acetylation of histones are characteristic changes in the system of epigenetic regulation of gene expression accompanying the process of malignant transformation of the cell. Vorinostat is the epigenetic modulator that actively used in clinical oncology practice. The antitumor activity of vorinostat is considered to be associated with only with the inhibition of histone deacetylases. The effects of this drug on histone methylation have not been sufficiently studied. Using the HeLa TI test system, which allows evaluating the integral effect of epigenetically active compounds by activating the expression of the reporter gene GFP, and knockdown of genes by small interfering RNAs, we showed that the inhibitory effect of vorinostat is directed not only at HDAC1, but also at EZH2, SUV39H1, SUV39H2, SUV420H1. Using Western blotting, the ability of vorinostat to suppress the expression of enzymes EZH2, SUV39H1/2, SUV420H1 was confirmed and, in addition, its ability to inhibit the expression of enzymes SUV420H2 and DOT1L was revealed. The data obtained expand the understanding of the epigenetic effects of vorinostat and demonstrate the need for a large-scale analysis of its activity in relation to other epigenetic enzymes. A detailed understanding of the mechanism of epigenetic action of vorinostat will contribute to its more adequate use in the treatment of tumors with an aberrant epigenetic profile.

Keywords: malignant neoplasms with aberrant epigenetic profile, vorinostat, SAHA, histone methylation, histone methyltransferases (HMTs), HeLa TI test system, SUV39H1, SUV39H2, EZH2, SUV420H1, SUV420H2, DOT1L