

УДК 577.218

ИНГИБИТОР GSK3 КИНАЗЫ CHIR ПОДАВЛЯЕТ ТРАНСКРИПЦИЮ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ИЗОФОРМ POU2F1 В КЛЕТКАХ ЛИМФОМЫ БЕРКИТТА *Namalwa*

© 2021 г. Е. В. Панкратова^{1,*}, Т. Н. Порцева¹, А. А. Макарова¹, академик РАН Ю. В. Ильин¹,
А. Г. Степченко¹, член-корреспондент РАН С. Г. Георгиева¹

Поступило 23.09.2020 г.
После доработки 15.10.2020 г.
Принято к публикации 16.10.2020 г.

POU2F1(Oct-1) транскрипционный фактор, оверэкспрессия которого обнаружена во многих злокачественных опухолях человека, значительное повышение его уровня в клетках определяет злокачественный потенциал опухоли. POU2F1 представлен несколькими изоформами, транскрибируемыми с альтернативных промоторов. В В-клеточной лимфоме Беркитта *Namalwa* концентрация тканеспецифичной изоформы Oct-1L в несколько раз выше, чем в нормальных В-клетках. Мы проверили потенциальную возможность ингибировать транскрипцию отдельных изоформ Oct-1, используя ингибитор GSK3 киназы – CHIR – производное аминопиримидина. Нами было показано, что CHIR специфически влияет на экспрессию тканеспецифической изоформы Oct-1L, значительно снижая уровень мРНК и белка Oct-1L, при этом CHIR не вызывает изменения количества мРНК и белка убиквитарной изоформы Oct-1A в опухолевых клетках *Namalwa*. Полученные результаты показывают, что возможно разработать систему избирательного ингибирования изоформ фактора транскрипции Oct-1 в клетках человека для подавления лекарственной устойчивости опухолевых клеток с высоким содержанием POU2F1.

Ключевые слова: фактор транскрипции POU2F1(Oct-1), альтернативные промоторы, GSK3 киназа
DOI: 10.31857/S2686738921010194

Белок POU2F1 (Oct-1) принадлежит к POU-семейству транскрипционных факторов [1, 2]. Oct-1 экспрессируется во всех клетках человека и контролирует эмбриональное развитие, дифференцировку, клеточный ответ на стресс [3, 4]. Способность Oct-1 регулировать широкий спектр функционально различных генов и процессов основан на его способности взаимодействовать с различными сайтами ДНК [5] и подвергаться множественным посттрансляционным модификациям. Изоформы Oct-1, различающиеся по последовательности N-концевого домена, транскрибируются с альтернативных промоторов и регулируют большое количество генов-мишеней, как индивидуальных для каждой изоформы, так и общих для всех изоформ Oct-1 [4, 6–8].

Высокий уровень POU2F1(Oct-1) обеспечивает стрессоустойчивость клетки при окислитель-

ном и цитотоксическом стрессах, а также при радиационном облучении, а степень его участия в этих процессах зависит от его концентрации в клетке [3, 9]. POU2F1(Oct-1) является проонкогенным фактором и имеет прогностическое значение в развитии и лечении широкого спектра злокачественных опухолей. Высокий уровень экспрессии POU2F1(Oct-1) в опухоли связан с плохим диагностическим прогнозом. Таким образом, Oct-1 значимый транскрипционный фактор, определяющий злокачественный потенциал опухоли [9, 10].

В большом количестве типов опухолей отмечается повышенная экспрессия Oct-1, однако довольно высокий уровень его экспрессии присутствует и во многих типах нераковых клеток и тканей. Это осложняет применение противоопухолевой терапии, основанной на полном или частичном подавлении Oct-1, без учета конкретной изоформы, которая подавляется.

Изоформы Oct-1 экспрессируются в нормальных клетках в некоторых относительно стабильных, для конкретных типов клеток, соотношениях [4, 7, 8]. Нарушение уровня экспрессии отдельных изоформ Oct-1 отмечается во многих типах

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), Москва, Россия

*e-mail: panliz@mail.ru

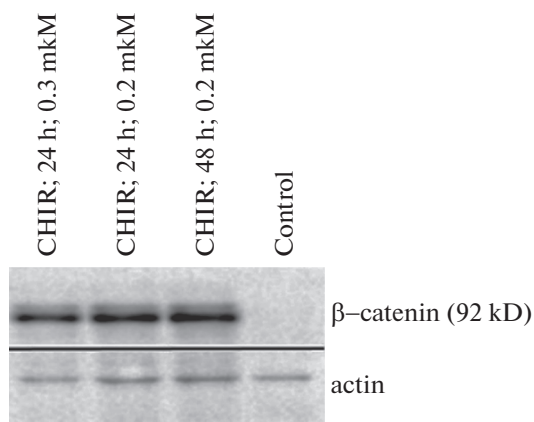


Рис. 1. Изменение количества В-катенина в клетках Namalwa при обработке CHIR. Вестерн-блот гибридизация с антителами к нефосфорилированному В-катенину. На дорожку нанесено по 10 мкг тотального клеточного белка.

тканей опухолевой природы и связано с нарушением регуляции альтернативных промоторов гена *POU2F1* (*Oct-1*) в опухолевых клетках. Так, например, в В-клеточной лимфоме Беркитта Namalwa концентрация тканеспецифичной изоформы *Oct-1L* в несколько раз выше, чем в нормальных В-клетках [4, 8].

Существование альтернативных промоторов в гене *POU2F1* (*Oct-1*) делает перспективной возможность влиять не только на экспрессию тотального *Oct-1*, но также на экспрессию отдельных его изоформ, уровень которых возрастает в опухолевых клетках.

В данной работе мы исследовали возможность избирательно влиять на экспрессию изоформ *Oct-1A* и *Oct-1L*, транскрибирующихся с альтернативных промоторов. Анализ распределения сайтов связывания в областях двух альтернативных промоторов гена *POU2F1* (*Oct-1*) показал, что транскрипция этого гена может находиться под контролем белков-мишеней для GSK3 (гликогенсинтаза киназа-3) – TCF/LEF и FOXO. В обоих промоторах присутствуют сайты связывания для транскрипционных факторов семейства TCF/LEF, через которые В-катенин заякоривается на промоторах генов-мишеней Wnt-сигнального пути, а также в промоторе L присутствуют сайты связывания для FOXO. Основываясь на анализе распределения сайтов связывания, мы предположили, что вещества, способные влиять на активность GSK3, могут избирательно влиять на активность этих промоторов.

Для фактора транскрипции *POU2F1* и GSK3 показано их участие в канцерогенезе. Однако связь GSK3 и гена *POU2F1* в регуляции канцерогенеза не изучена. Функции GSK3 в развитии опухоли неоднозначны. GSK3 может быть как су-

прессором опухолей, так и активатором опухолевого роста, в зависимости от типа опухоли. Высокий уровень GSK3 в клетке ингибирует опухолевый рост при опухолях молочной железы и при меланоме, но усиливает рост опухоли поджелудочной железы и при лейкемии.

Плейотропный эффект GSK3 связан с ее центральной ролью в разных сигнальных путях: Notch, Wnt, Hedgehog, NF- κ B [11].

Мы проверили потенциальную возможность ингибировать отдельные изоформы *Oct-1*, используя ингибитор GSK3 – CHIR – производное аминопиримидина, обладающее высоким сродством к GSK3 α основной киназе и инактивирующее ее. CHIR является активатором Wnt-сигнального пути, а одной из наиболее изученных мишеней GSK3 является В-катенин – ключевой компонент Wnt-сигнального пути. Инактивация В-катенина осуществляется активной киназой GSK3, которая фосфорилирует В-катенин, после чего он попадает в протеосомы и деградирует. Активный нефосфорилированный В-катенин взаимодействует с транскрипционными факторами семейства TCF/LEF и активирует транскрипцию генов Wnt-сигнального пути, но также В-катенин может участвовать в альтернативных путях регуляции транскрипции [12, 13].

Поскольку белок В-катенин является одним из самых изученных субстратов для GSK3, сначала мы исследовали влияние CHIR на экспрессию этого белка в клетках линии Namalwa. Нами были использованы первичные антитела, способные связывать только нефосфорилированный (транскрипционно активный) свободный В-катенин.

В данном эксперименте мы показали, что CHIR значительно увеличивает концентрацию свободного В-катенина в цитоплазме клеток лимфомы Беркитта Namalwa. Таким образом, было установлено, что CHIR, подходит для дальнейшей работы с линией клеток Namalwa. Помимо представленных на рис. 1, нами были опробованы различные концентрации CHIR: 0.6, 0.4, 0.1 и 0.05 мкМ. Минимальная концентрация CHIR достаточная для визуально определяемого повышения уровня В-катенина в клетках Namalw, составила 0.05 мкМ.

CHIR подавляет транскрипцию с тканеспецифического промотора гена *POU2F1*.

На следующем этапе нами было изучено влияние CHIR на транскрипцию с двух альтернативных промоторов гена *POU2F1* методом обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени. Для ПЦР были использованы праймеры: *Oct-1A* A-Forw 5'-tattcaaaatggcggacga-3'; *Oct-1L* L-Forw 5'-ссасссссааactgctacctgt-3'; реверсный праймер для всех изоформ Rev-A, L 5'-ctgacggattgtcattcttgagt-3'. Нами было показано, что при культивировании клеток Namalwa в течение 24 ч в среде, содержа-

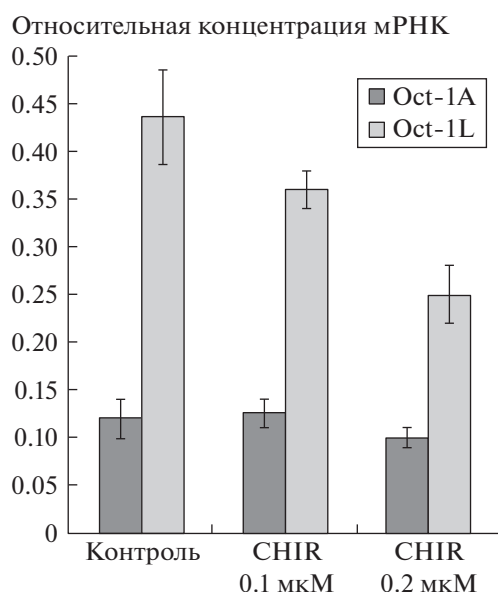


Рис. 2. Влияние CHIR на транскрипцию с альтернативных промоторов U и L гена *POU2F1* (*Oct-1*). Количественный ПЦР.

шей CHIR, количество мРНК изоформы Oct-1L, транскрибирующейся с альтернативного тканеспецифического промотора L, снижается примерно в 1.8 раза, тогда как количество мРНК убиквитарной изоформы Oct-1A не изменяется (рис. 2). Уровень снижения количества мРНК Oct-1L зависит от концентрации CHIR.

Из представленных результатов видно, что CHIR подавляет транскрипцию с промотора L (с которого транскрибируется тканеспецифическая изоформа Oct-1L), но не влияет на транскрипцию промотора U (с которого транскрибируются убиквитарная изоформа Oct-1A).

CHIR вызывает снижение количества белка Oct-1L в клетках линии Namalwa.

Одновременно мы анализировали изменение количества белка изоформ Oct-1L и Oct-1A методом Вестерн-блот гибридизации с антителами, специфичными к изоформе Oct-1L или к изоформе Oct-1A [4]. Из результатов эксперимента следует, что под действием CHIR значительно уменьшается количество изоформы Oct-1L, тогда как количество изоформы Oct-1A не изменяется (рис. 3).

Таким образом, CHIR специфически влияет на экспрессию тканеспецифической изоформы Oct-1L, значительно снижая уровень мРНК и белка Oct-1L, при этом CHIR не вызывает изменения количества мРНК и белка Oct-1A. Анализ сайтов связывания показал, что в регуляторной области промотора L присутствует несколько потенциальных сайтов связывания для белков-мишеней GSK3 – транскрипционных факторов семейств TCF и FOXO, а в промоторе U обнаружен участок связывания для TCF7L2.

CHIR считается активатором Wnt сигнального пути, так как высокоспецифично связывает GSK3, инактивируя ее, тем самым предотвращая фосфорилирование В-катенина этой киназой и его дальнейшую деградацию. Известно, что комплекс TCL-В-катенин на промоторе генов-мишеней вызывает активацию транскрипции. В обоих промоторах гена *POU2F1* есть сайты связывания для TCL, но под действием CHIR наблюдается репрессия транскрипции с тканеспецифического промотора, но одновременно не изменяется транскрипция с убиквитарного промотора. Это дает возможность предположить, что GSK3 изменяет транскрипцию с альтернативных промоторов гена *POU2F1* не через Wnt-сигнальный путь. Для подтверждения этого предположения мы использовали высокоспецифичный

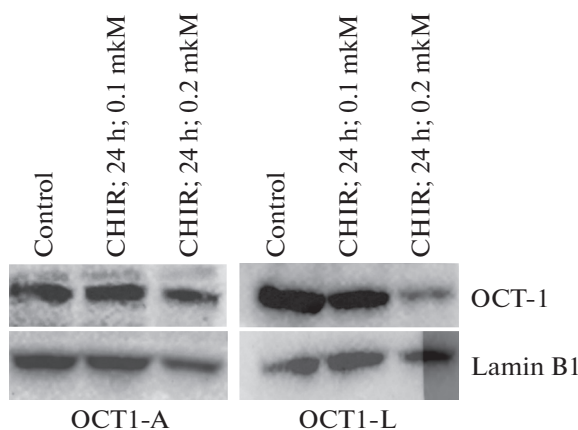


Рис. 3. Влияние CHIR на экспрессию изоформ Oct-A и Oct-L в клетках Namalwa. Вестерн-блот гибридизация с антителами к изоформе Oct-1A или Oct-1L. На дорожку нанесено по 15 мкг общего клеточного белка.

ингибитор Wnt-сигнального пути – пирвиниум. Обработка клеток Namalwa в течение 24 или 48 ч пирвиниумом в концентрации 2.2 мкМ не привела к изменению уровня транскрипции с альтернативных промоторов гена POU2F1, этот факт является подтверждением нашего предположения, что ингибитор GSK3 подавляет транскрипцию с тканеспецифического промотора гена POU2F1 не через Wnt-сигнальный путь.

Мы предполагаем, что мишенью GSK3 является FOXO, сайты связывания для которого обнаружены нами в тканеспецифичном промоторе L. Из литературных данных известно, что у человека GSK3 позитивно регулирует активность FOXO1 и стимулирует экспрессию IGF-IR [14], также показано, что у *Drosophila melanogaster* GSK3 напрямую активирует dFOXO.

Фосфорилирование белков GSK3 киназой может как позитивно, так и негативно влиять на функции белка-мишени. Фосфорилирование белков MafA, SRC-3, BCL-3 индуцирует или активацию или деградацию и изменяет их активность [9, 14, 15].

Нами было показано влияние CHIR – ингибитора GSK3 – на снижение количества мРНК и белка изоформы Oct-1L в опухолевых клетках Namalwa, и мы предполагаем, что это влияние осуществляется через FOXO. Ранее нами было показано, что в клетках лимфомы Бэркитта Namalwa уровень экспрессии этой изоформы повышен в несколько раз по сравнению с нормальными В-клетками. Полученные результаты демонстрируют, что возможно разработать систему избирательного ингибирования изоформ фактора транскрипции Oct-1 в клетках человека для подавления лекарственной устойчивости опухолевых клеток с высоким содержанием Oct-1.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта российского научного фонда (грант № 19-14-00365).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Herr W.S.R. The POU domain: a large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2, and *Caenorhabditis elegans* unc-86 gene products. // *Genes Dev.* 1988. V. 2(12A), P. 1513–1516. <https://doi.org/10.1101/gad.2.12a.1513>
2. Stepchenko A.G. The nucleotide sequence of mouse OCT-1 cDNA. // *Nucl. Acids Res.* 1992. V. 20. № 6. P. 1419.
3. Maddox J., Shakya A., South S., et al. Transcription Factor Oct1 Is a Somatic and Cancer Stem Cell Determinant. // *PLoS Genet.*, 2012. V. 8 (12), e1003048. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003048>
4. Pankratova E.V., Stepchenko A.G., Portseva T., Mogila V.A., Georgieva S.G. Different N-terminal isoforms of Oct-1 control expression of distinct sets of genes and their high levels in Namalwa Burkitt's lymphoma cells affect a wide range of cellular processes. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44(19), P. 9218–9230. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw623>
5. Stepchenko A.G., Luchina N.N., Pankratova E.V. Cysteine 50 of the POU H domain determines the range of targets recognized by POU proteins. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25 39. P. 2847–2853, 5401–5411.
6. Pankratova E.V., Deyev I.E., Zhenilo S.V., Polanovsky O.L. Tissue-specific isoforms of the ubiquitous transcription factor Oct-1 (2001) *Mol. Genet. Genom.* V. 266. № 2. P. 239–245.
7. Luchina N.N., Krivega I.V., Pankratova E.V. Human Oct-1L isoform has tissue-specific expression pattern similar to Oct-2. // *Immunol. Lett.* 2003. V. 85. P. 237–241.
8. Pankratova E.V., Stepchenko A.G., Krylova I.D., Portseva T.N., Georgieva S.G. The regulatory interplay between Oct-1 isoforms contributes to hematopoiesis and the isoforms imbalance correlates with a malignant transformation of B cells. // *Oncotarget*, 2018. V. 9. P. 29892–29905. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25648>
9. Vázquez-Arreguín K, Tantin D. The Oct1 transcription factor and epithelial malignancies: Old protein learns new tricks. // *Biochim Biophys Acta*, 2016. V. 1859. P. 792–804. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.02.007>
10. Qian J, Kong X, Deng N, et al. OCT1 is a determinant of synbindin-related ERK signalling with independent prognostic significance in gastric cancer. // *Gut*. 2015. V. 64 (1). P. 37–48. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306584>
11. Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. // *Pharmacol Ther.* 2015. V. 148, P. 114–131. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.016>
12. Doumpas N, Lampart F, Robinson MD, et al. TCF/LEF dependent and independent transcriptional regulation of Wnt/ β -catenin target genes. // *EMBO J*, 2019. V. 38 (2), e98873. <https://doi.org/10.15252/emboj.201798873>
13. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of β -catenin. // *EMBO J*. 2012. V. 31 (12). P. 2714–2736. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.150>
14. Sakamaki J, Daitoku H, Kaneko Y, et al. GSK3 regulates gluconeogenic gene expression through HNF4 and FOXO1. // *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 2012. V. 32. P. 96–101.
15. Viatour P, Dejardin E, Warnier M, et al. GSK3-mediated BCL-3 phosphorylation modulates its degradation and its oncogenicity. // *Mol. Cell*. 2004. V. 16. P. 35–45.

GSK3 KINASE INHIBITOR, CHIR, SUPPRESS TRANSCRIPTION OF TISSUE SPECIFIC POU2F1 ISOFORM IN Burkitt Namalwa LYMPHOMA CELLS

**E. V. Pankratova^{a,#}, T. N. Portseva^a, A. A. Makarova^a, Academician of the RAS Yu. V. Ilyin^a,
A. G. Stepchenko^a, and Corresponding Member of RAS S. G. Georgieva^a**

^a Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: panliz@mail.ru

POU2F1 (Oct-1) is a transcription factor, the overexpression of which is found in many human malignant tumors; a significant increase in its level in cells determines the malignant potential of the tumor. POU2F1 is represented in cells by several isoforms that are transcribed from alternative promoters. In Burkitt's B-cell lymphoma Namalwa, the concentration of tissue-specific isoform Oct-1L is several times higher than in normal B cells. We tested the potential to inhibit the transcription of individual Oct-1 isoforms using the GSK3 kinase inhibitor CHIR, an aminopyrimidine derivative. We have shown that CHIR specifically affects the expression of the tissue-specific isoform Oct-1L, significantly reducing the level of mRNA and Oct-1L protein, while CHIR does not change the amount of mRNA and protein of the ubiquitous isoform Oct-1A in Namalwa tumor cells. The results obtained show that it is possible to develop a system for selective inhibition of Oct-1 transcription factor isoforms in human cells to suppress drug resistance of tumor cells with a high POU2F1 content.

Keywords: transcription factor POU2F1(Oct-1), alternative promoters, GSK3 kinase