

УДК 615.332, 577.181.5

ИНГИБИРОВАНИЕ ОНКОГЕНА *c*-МУС АНТИБИОТИКАМИ-ПРОИЗВОДНЫМИ АУРЕОЛОВОЙ КИСЛОТЫ

© 2021 г. А. К. Исагулиева^{1,2,*}, Н. В. Сошникова¹, А. А. Штиль³

Представлено академиком РАН П.Г. Георгиевым

Поступило 27.04.2021 г.

После доработки 06.05.2021 г.

Принято к публикации 07.05.2021 г.

Внутриклеточные мишени антибиотиков-производных ауреоловой кислоты – оливомицин А и его полусинтетического производного оливамида – GC-богатые участки в малой бороздке ДНК. Нами установлено, что оба соединения в наномолярных концентрациях ингибируют транскрипцию онкогена *c*-Мус в опухолевых клетках человека. Механизм ингибирования не требует взаимодействия антибиотиков с полноразмерным сайтом связывания GC-специфического транскрипционного фактора Sp1, а обусловлен присутствием GC-квartetов с оптимальной константой комплексообразования.

Ключевые слова: противоопухолевые антибиотики, оливомицин А, онкоген *c*-Мус, транскрипция, низкомолекулярные химические соединения

DOI: 10.31857/S2686738921050152

Оливомицин А (**I**; рис. 1) и другие антибиотико-производные ауреоловой кислоты активно исследовались и некоторое время применялись в качестве противоопухолевых агентов. Мишень этих соединений – малая бороздка ДНК [1, 2]. Образование стабильного комплекса **I** с мишенью приводит к ингибированию транскрипции и репликации; гибель опухолевых клеток достигается в наномолярных концентрациях [3]. Общерезорбтивная токсичность ограничивает клиническое использование столь активного природного соединения. Требуется исследование молекулярных механизмов действия **I** для создания его эффективных и менее токсичных аналогов.

Предпочтительные сайты связывания **I** содержат GC-квartetы; наибольшую константу связывания обеспечивают центральные динуклеотиды

5'-GG-3' или 5'-GC-3' [4]. Подобные последовательности часто встречаются в регуляторных областях генов и могут полностью или частично перекрываться участками узнавания транскрипционных факторов (ТФ), например, Sp1. Аффинность к ДНК и выраженная GC-специфичность объясняют способность **I** и других соединений этого класса ингибировать транскрипцию генов. Детальное изучение комплексов с ДНК позволило создать полусинтетический аналог **I** – оливаמיד (**II**; рис.1) с уменьшенной константой комплексообразования, терапевтической активностью и переносимостью в моделях *in vivo* [5].

Антибиотик **I** подавляет экспрессию *c*-Мус – онкогена [6, 7], экспрессированного во многих опухолях [8]. Существенная часть транскрибируемого участка гена *c*-Мус, а также его 5'-UTR область представлены CpG-богатыми участками и содержат GC-консенсусы, с которыми способны связываться **I** и **II** [9]. Промоторы P0-P3 гена *c*-Мус также содержат GC-богатые области. Правомерно предположить, что подавление транскрипции *c*-Мус может происходить из-за связывания **I** и **II** с регуляторными участками гена или с сайтами связывания ТФ. Взаимодействуют ли **I** и **II** только с определенными регуляторными областями, в частности, с консенсусными участками для GC-зависимых ТФ, или и с другими GC-участками?

¹ ФГБУН Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

² ФГБНУ Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, Россия

³ ФГБНУ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, Россия

*e-mail: kia2303@ya.ru

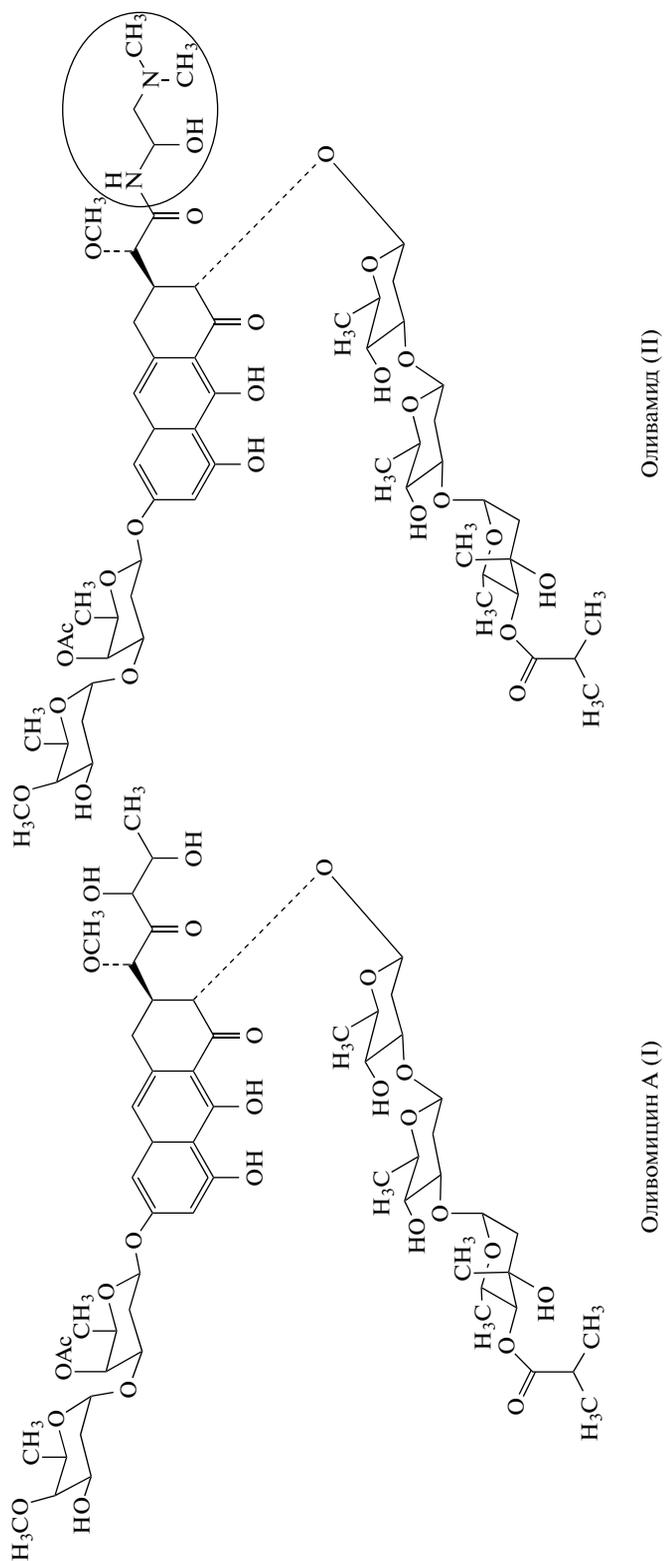


Рис. 1. Формулы оливомицина А (I) и его полусинтетического аналога оливамида (II).

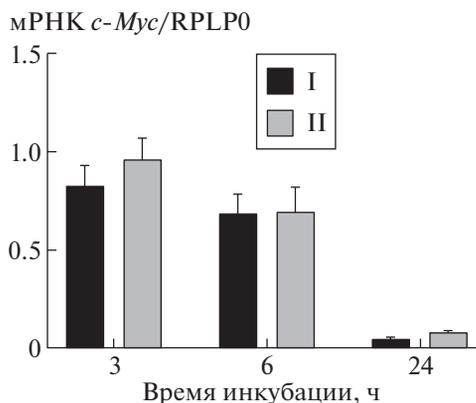


Рис. 2. Уровень мРНК *c-Myc* в клетках НСТ116 после инкубации с соединениями I и II (100 нМ) в течение 3–24 ч. Уровень мРНК *c-Myc* в необработанных клетках принят за 1. Представлены средние величины и стандартные отклонения по результатам трех экспериментов.

В настоящей работе ингибирование *c-Myc* соединениями I и II исследовали на культивируемых опухолевых клетках человека: родительской линии НСТ116 (аденокарцинома кишки) и сублиниях НСТ116TRE-CMV-FI-*cMyc* и А375-TRE-CMV-FI-*cMyc* (меланома) с соответствующими индуцибельными генетическими конструкциями.

Относительное содержание мРНК эндогенного *c-Myc* определяли на клетках НСТ116. После добавления I или II (100 нМ) клетки НСТ116 инкубировали в течение 3–24 ч и оценивали уровень мРНК *c-Myc* с помощью количественной ПЦР после обратной транскрипции. Интенсивность сигналов рассчитывали относительно уровня мРНК гена *RPLP0*. Соединения I и II после 6 ч инкубации снижали количество мРНК *c-Myc* на ~25% по сравнению с интактными клетками (рис. 2); к 24 ч транскрипты *c-Myc* почти не определялись.

Известно, что производные ауреоловой кислоты ингибируют транскрипцию Sp1-зависимых генов [10]. Консенсусный участок связывания ТФ Sp1 (G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T) содержит GC-участки – вероятные сайты связывания I. Показано, что производные ауреоловой кислоты специфичны именно для Sp1-зависимых промоторов [10, 11]. Однако экспрессия самого Sp1 также ингибируется производными ауреоловой кислоты [11, 12]; 5'-нетранслируемый район и область старта транскрипции этого гена содержат большое число CpG-островков. Для решения вопроса о том, обязательно ли мишень I и II должна включать сайт взаимодействия указанного ТФ, получена сублиния клеток НСТ116-TRE-CMV-FI-*cMyc* с возможностью индукции экзогенного *c-Myc* доксициклином (Dox). Генетическая кон-

струкция, использованная для получения сублинии, включала последовательность TRE-CMV, не имеющую GC-участков связывания Sp1 (рис. 3а, верхняя и средняя панели).

Принцип функционирования индуцибельной системы Tet-On: в отсутствие Dox элемент rTA блокирует инициацию транскрипции (верхняя панель); Dox связывает элемент rTA, активируя транскрипцию (средняя панель). Связывание I или II с GC-участками возможно только в CMV-промоторе (нижняя панель), поэтому действие антибиотиков на экспрессию репортерного гена *c-Myc* обусловлено их комплексобразованием только с этими участками.

Экспрессию рекомбинантного белка FI-*cMyc* активировали добавлением Dox (рис. 3б). Соединение I (100 нМ, 24 ч) полностью подавляло экспрессию эндогенного *c-Myc*. В комбинации с Dox I ингибировал и эндогенный белок *c-Myc*, и экзогенную форму, активируемую Dox. Схожие эффекты наблюдали при добавлении I и II к клеткам сублинии А375-TRE-CMV-FI-*cMyc* (конструкция FI-*cMyc* под контролем Tet-On элемента и CMV-промотора; рис. 3в). Соединения I и II оказывали выраженный ингибирующий эффект на обе формы белка *cMyc* (рис. 3в, дорожки 3, 4 и 6, 7 по сравнению с контролями). Если клетки предварительно инкубировали 1 ч с Dox, подавление *cMyc* было менее выраженным (рис. 3в, дорожки 5 и 8). Сравнивая эффективность I и II для разных линий клеток, можно предположить, что степень ингибирования эндогенного и экзогенного *cMyc* может быть тканеспецифичной и определяться молекулярным окружением генов-мишеней и отдельных сайтов связывания I и II.

Полученные результаты подтверждают предположение о том, что для связывания с ДНК и ингибирования транскрипции производными ауреоловой кислоты наличие полноразмерного сайта связывания Sp1 не обязательно. Определяющим для формирования комплекса с ДНК и, следовательно, ингибирования транскрипции являются предпочтительные для I или II GC-участки. Таким образом, производные ауреоловой кислоты ингибируют транскрипцию не сайт-специфическим, а сиквенс-специфическим образом. Для I нуклеотидные последовательности в GC-квартетах, предпочтительные для формирования стабильных комплексов, установлены [4]; требуется выявить закономерности предпочтения для II. Важно, что активность II как ингибитора онкогена *c-Myc* почти не уступает I. Наряду со способностью вызывать гибель опухолевых клеток разного тканевого происхождения и приемлемыми характеристиками *in vivo* [5], оливамид II приобретает значение противоопухолевого лекарственного “кандидата”.

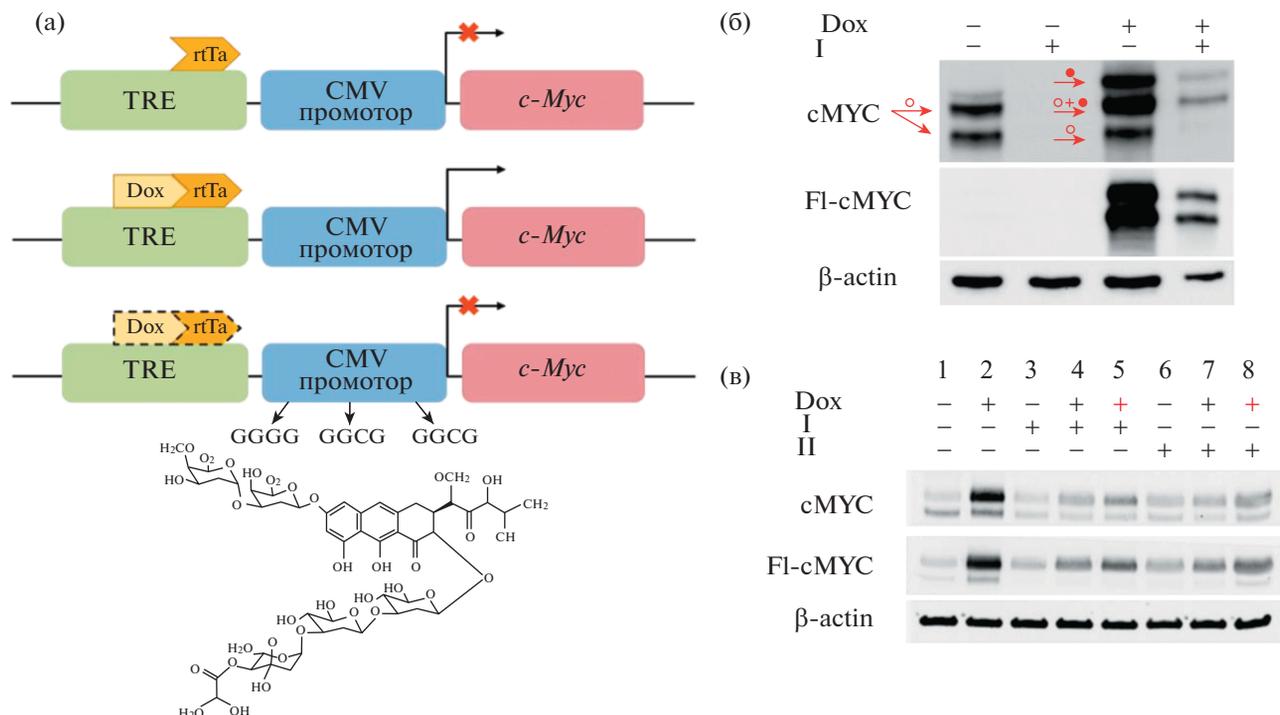


Рис. 3. Ингибирование активации *c-Myc* под действием **I** и **II**.

а – Схема фрагмента плазмидной конструкции TRE-CMV-FI-cMyc и экспрессии FI-cMyc при добавлении **I** (100 нМ) и Dox (1 мкг/мл); б – иммуноблоттинг лизатов клеток HCT116-TRE-CMV-FI-cMYC при добавлении **I** и доксициклина (Dox), стрелками обозначены эндогенная (o) и экзогенная (*) формы белка cMyc; в – иммуноблоттинг лизатов клеток A375-TRE-CMV-FI-cMyc при действии Dox, **I** и **II**: в дорожках 4 и 7 вначале добавляли **I/II**, через 1 ч вносили Dox; в дорожках 5 и 8 – обратный порядок добавления модуляторов. Бета-актин использовали для нормализации – контроля внесения белков в полиакриламидный гель.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90064.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брикеништейн В.Х., Путина Л.Р., Баренбойм Г.М., и др. Стереохимия и кинетика взаимодействия с ДНК противоопухолевого антибиотика оливомицина // Мол. биология. 1984. Т. 18, № 4. С. 1606–1616.
2. Lombó F., Menéndez N., Salas J.A., et al. The aureolic acid family of antitumor compounds: structure, mode of action, biosynthesis, and novel derivatives // Applied Microbiology and Biotechnology. 2006. V. 73. № 1. P. 1–14.
3. Sabín J.G., Morís F. Exploring Novel Opportunities for Aureolic Acids as Anticancer Drugs // Biochemistry & Pharmacology: Open Access. 2013. V. 2. № 1. P. 1–3.
4. Beniaminov A.D., Chashchina G.V., Livshits M.A., et al. Discrimination between G/C Binding Sites by Olivomycin A Is Determined by Kinetics of the Drug-DNA Interaction // International Journal of Molecular Sciences. 2020. V. 21. № 15. P. 5299.
5. Teyvashova A.N., Shtil A.A., Olsufyeva E.N., et al. Modification of olivomycin A at the side chain of the aglycon yields the derivative with perspective antitumor characteristics // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2011. V. 19. № 24. P. 7387–7393.
6. Самусенко А.В. Механизмы гибели клеток при действии оливомицина и его производных: Дисс. канд. мед. наук. Москва; 2009.
7. Isagulieva A.K., Beniaminov A.D., Tatarskiy V.V., et al. Targeting gene transcription: mechanisms of antitumor potency of Olivomycin A and its preclinical derivative [letter] // FEBS Open Bio. 2019. V. 9. S1. P. 153.
8. Vita M., Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer // Seminars in Cancer Biology. 2006. V. 16. № 4. P. 318–330.
9. Mognol G.P., de Araujo-Souza P.S., Robbs B.K., et al. Transcriptional regulation of the c-Myc promoter by NFAT1 involves negative and positive NFAT-responsive elements // Cell Cycle. 2012. V. 11. № 5. P. 1014–1028.
10. Previdi S., Malek A., Albertini V., et al. Inhibition of Sp1-dependent transcription and antitumor activity of the new aureolic acid analogues mithramycin SDK and

- SK in human ovarian cancer xenografts // *Gynecologic Oncology*. 2010. V. 118. № 2. P. 182–188.
11. *Sleiman S.F., Langley B.C., Basso M., et al.* Mithramycin Is a Gene-Selective Sp1 Inhibitor That Identifies a Biological Intersection between Cancer and Neurodegeneration // *Journal of Neuroscience*. 2011. V. 31. № 18. P. 6858–6870.
12. *Choi E.-S., Nam J.-S., Jung J.-Y., et al.* Modulation of specificity protein 1 by mithramycin A as a novel therapeutic strategy for cervical cancer // *Scientific Report*. 2014. V. 4. № 1. P. 1–8.

INHIBITION OF THE *c-Myc* ONCOGENE BY THE AUREOLIC ACID GROUP ANTIBIOTICS

A. K. Isagulieva^{a,b,#}, N. V. Soshnikova^a, and A. A. Shtil^c

^a *Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^b *Federal State Budgetary Scientific Institution Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russian Federation*

^c *Federal State Budgetary Scientific Institution “N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: kia2303@ya.ru*

Presented by academician of the RAS P.G. Georgiev

GC-rich stretches in the DNA minor groove are the established intracellular targets for the aureolic acid group of antibiotics such as olivomycin A and its semi-synthetic analogue olivamide. We demonstrated here that both antibiotics at nanomolar concentrations inhibited transcription of the *c-Myc* oncogene in cultured human tumor cells. The mechanism of transcriptional inhibition did not require the full length binding site for Sp1, a GC-dependent transcriptional factor. GC quartets with the nucleotide sequences optimal for drug binding are sufficient for *c-Myc* transcriptional block by the aureolic acid derivatives.

Keywords: antitumor antibiotics, olivomycin A, *c-Myc* oncogene, transcription, low molecular weight chemical compounds