

УДК 577.218

5-АЗАЦИТИДИН ПОДАВЛЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ИЗОФОРМ OCT-1 В В-КЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОБЛАСТНОЙ ЛИНИИ NAMALWA

© 2022 г. А. П. Котнова^{1,*}, А. Г. Степченко¹, академик РАН Ю. В. Ильин¹,
член-корреспондент РАН С. Г. Георгиева¹, Е. В. Панкратова¹

Поступило 30.11.2021 г.

После доработки 16.12.2021 г.

Принято к публикации 16.12.2021 г.

Сверхэкспрессия транскрипционного фактора POU2F1(Oct-1) при канцерогенезе у человека повышает злокачественный потенциал опухоли и определяет неблагоприятный прогноз как для солидных, так и для гематологических случаев заболевания. При остром миелодиспластическом лейкозе (ОМЛ) уровень Oct-1 определяет скорость развития заболевания, а понижение его экспрессии значительно задерживает развитие лейкоза у мышей, однако полный нокаут Oct-1 приводит к гибели животных. POU2F1(Oct-1) экспрессируется в клетках в виде нескольких изоформ, транскрибирующихся с альтернативных промоторов. Среди них есть как убиквитарная, так и тканеспецифические изоформы. Мы показали, что в клетках лимфомы Беркитта Namalwa 5-азациитидин специфически подавляет экспрессию мРНК тканеспецифической изоформы Oct-1L, уровень которой аномально повышен в этих клетках, при этом не вызывая изменений количества мРНК убиквитарной изоформы Oct-1A. Полученные результаты показывают, что можно избирательно понижать уровень транскрипции изоформы Oct-1L, аберрантно экспрессирующейся в опухолевых клетках человека.

Ключевые слова: фактор транскрипции POU2F1(Oct-1), альтернативные промоторы, 5-азациитидин, лимфома Беркитта

DOI: 10.31857/S2686738922020123

Злокачественные опухоли кроветворной и лимфоидной ткани составляют примерно 8% всех злокачественных заболеваний. Они делятся на две большие группы – лимфомы и лейкозы; многие из них характеризуются неблагоприятным прогнозом и низким уровнем выживаемости. Поиск маркеров и терапевтических мишеней для персонализированного лечения онкологических заболеваний показал, что продукт гена POU2F1(Oct-1) является чрезвычайно значимым фактором развития и прогрессирования многих злокачественных опухолей как эпителиального происхождения, так и опухолей кроветворной и лимфоидной ткани [1].

Фактор транскрипции Oct-1 принадлежит к семейству POU-факторов транскрипции с высококонсервативным ДНК-связывающим доменом и контролирует дифференцировку, выживаемость

и пролиферацию клеток иммунной системы и гемопоэтических клеток [2, 3]. Oct-1 экспрессируется во всех клетках организма, регулирует дифференцировку В-, Т-клеток и стволовых гемопоэтических клеток [2, 3] и является фактором защиты клетки от разных видов стресса: генотоксического, окислительного, гипоксического, стресса эндоплазматического ретикулума, а также модулирует ответ клетки на химиотерапевтические препараты [4, 5].

Повышение уровня экспрессии Oct-1 в опухолевых клетках вносит существенный вклад в неблагоприятный прогноз развития онкологических заболеваний. Так, например, определение уровня экспрессии POU2F1(Oct-1) при раке желудка имеет даже более высокое прогностическое значение, чем определение стадии (I-IV) заболевания по AJCC [6]. Для опухолей кроветворной системы проонкогенные функции Oct-1 были описаны для лимфомы Ходжкина, лимфомы тимуса, диффузной крупноклеточной В-лимфомы, острого миелоидного лейкоза [7–9]. Сверхэкспрессия Oct-1 часто наблюдается при диффузной В-крупноклеточной лимфоме и является независимым прогностическим фактором неблагоприятного

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

*e-mail: alina_kotnova@mail.ru

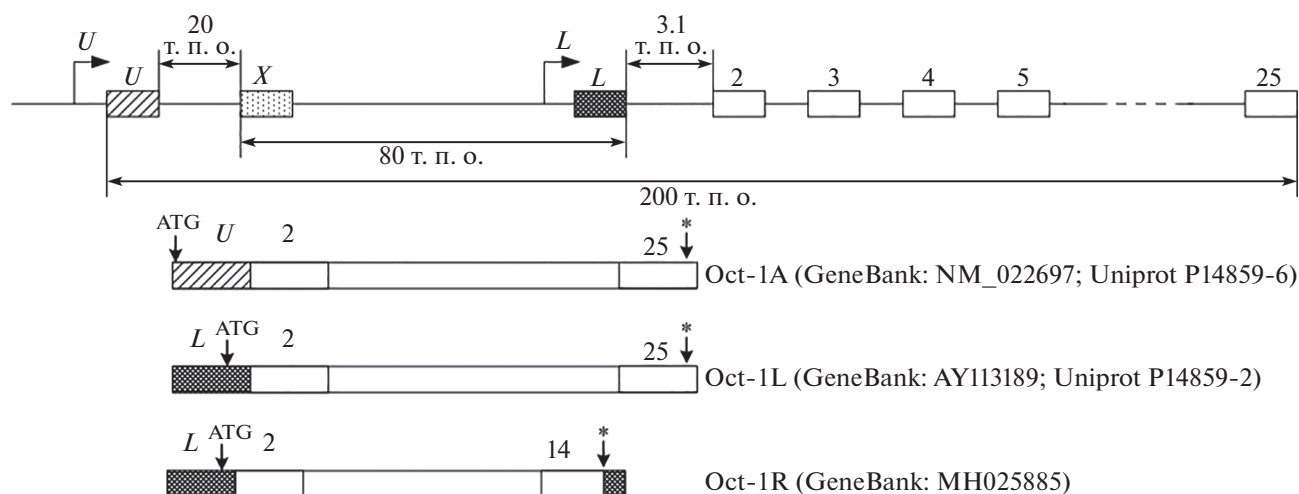


Рис. 1. Экзон-интронная организация гена POU2F1 (Oct-1). Схема строения изоформ, транскрибирующихся с убиквитарного промотора U и тканеспецифического промотора L. Экзоны обозначены прямоугольниками. Альтернативные 5'-концевые экзоны обозначены штриховкой. Начало транскрипции показано на схеме гена поворотными стрелками. Начало трансляции и стоп-кодоны обозначены стрелками и звездочками соответственно.

ятного исхода [8]. Oct-1 является важным регулятором лейкогенности и гемопоэтического стресса. Высокий уровень экспрессии фактора транскрипции Oct-1 защищает гемопоэтические клетки от стресса, но способствует развитию лимфомы тимуса [1] и острого миелоидного лейкоза [9] у мышей. Напротив, подавление Oct-1 защищает мышей от лейкемии, вызванной гибридным онкопротеином MLL-AF9. Комбинация этой модельной системы ОМЛ с нокаутом Oct-1 показала, что потеря одного аллеля Oct-1 значительно задерживает развитие лейкоза. Делеция обоих аллелей Oct-1 полностью защищает мышей от лейкоза, но приводит к недостаточности костного мозга и гибели животных. [9]. Анализ этих данных указывает на то, что Oct-1 – мощный фактор, определяющий злокачественный потенциал опухоли и ее ответ на действие химиотерапевтических препаратов.

Полифункциональность Oct-1 в значительной степени определяется тем, что он существует в клетке в виде ряда различных изоформ, которые образуются за счет альтернативного сплайсинга и/или альтернативной инициации транскрипции [10]. В гене POU2F1 существуют альтернативные промоторы [10–12]. Как видно из рис. 1, считываемые с них транскрипты имеют разные первые экзоны и кодируют изоформы, различающиеся своими N-концевыми последовательностями [11]: убиквитарная изоформа Oct-1A считывается с промотора U, а тканеспецифические изоформы Oct-1L и Oct-1R – с промотора L.

Экспрессия изоформ Oct-1 изменяется во время дифференцировки гемопоэтических клеток: в плюрипотентных гемопоэтических клетках CD34+ (ПГК) Oct-1L экспрессируется на высо-

ком уровне; во время дифференцировки Т-клеток (CD3+) и клеток моноцитарного ряда (CD14+) его уровень экспрессии резко падает, но при этом почти не изменяется при дифференцировке В-клеток (CD19+) [13, 14]. Изоформа Oct-1R у человека экспрессируется только в В-клетках, в ПГК она не обнаружена [13]. Характерно, что уровень убиквитарной изоформы Oct-1A не претерпевает значительных изменений при дифференцировке гемопоэтических клеток.

Во всех нормальных кроветворных клетках активность тканеспецифического промотора L, а следовательно, и концентрация тканеспецифических изоформ, ниже, чем активность убиквитарного промотора U и концентрация убиквитарной изоформы Oct-1A. При этом в В-клеточных лимфомах Беркитта Namalwa и Raji данное соотношение нарушено, и концентрация изоформы L значительно превосходит содержание в клетках изоформы A. Концентрация тканеспецифичной изоформы Oct-1L в В-клетках Namalwa в несколько раз выше, чем в нормальных В-клетках (CD19+) [13]; уровень ее экспрессии также повышен в Т-клеточной линии Jurkat по сравнению с нормальными Т-клетками (CD3+) [13]. Примечательно, что все эти клеточные линии изначально были получены из низкодифференцированных лимфоцитов.

Ранее было показано, что сверхэкспрессия Oct-1R и Oct-1L в клетках Namalwa приводит к репрессии многих генов, участвующих в дифференцировке В- и Т-лимфоцитов, а также клеток моноцитарного ряда (CD14+) [13, 14]. Высокий уровень изоформы Oct-1L, наблюдаемый в лимфоцитарных линиях опухолевых клеток, показывает, что избыток Oct-1L, по всей видимости,

значительно уменьшает их способность к дифференцировке. Существование альтернативных промоторов в гене POU2F1(Oct-1) позволяет влиять не только на экспрессию тотального Oct-1, что губительно сказывается на организме, но также на экспрессию отдельных его изоформ, уровень которых повышен в опухолевых клетках.

В данной работе мы исследовали влияние 5-азациитидина на транскрипцию гена POU2F1 и показали, что он избирательно подавляет транскрипцию с тканеспецифического L-промотора гена POU2F1 и уменьшает концентрацию изоформы Oct-L в опухолевых клетках лимфомы Беркитта Namalwa.

Ингибитор метилирования ДНК 5-азациитидин применяется в клинической практике для лечения миелодиспластического синдрома (МДС) и острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). Для изучения его влияния на уровень транскрипции альтернативных изоформ белка Oct-1 клетки Namalwa рассеивали в 6-луночные планшеты по 2×10^6 на лунку в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки. К клеткам добавляли 5-азациитидин (5-Azacytidine, Sigma-Aldrich), растворенный в 8 мкл ДМСО, в следующих концентрациях: 10, 5, 2.5, 1.25 μM . В контрольные лунки добавляли по 8 мкл ДМСО. Для оценки воздействия 5-азациитидина на уровень транскрипции разных изоформ Oct-1 из клеточной культуры выделяли РНК тризольным методом, после чего проводили обратную транскрипцию с использованием набора Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific) и ПЦР в реальном времени с использованием праймеров, специфичных к изоформам А и L (Oct-1A-sense: 5'-tattcaaatggcgacgga-3'; Oct-1L-sense: 5'-ссассссааactgctacctgt-3'; Oct-1-antisense, общий для обеих изоформ: 5'-ctgacggattgtcattcttgagt-3'). Нормировку проводили по гену GUS: GUS sense: 5'-cgtggtggagagctcatttga-3' и GUS antisense 5'-atccaccagcactctcgtcgt-3'.

Как видно из рис. 2, при культивировании клеток Namalwa в течение 24 ч в среде, содержащей 5-азациитидин, значительно снижается количество изоформы Oct-1L, транскрибирующейся с альтернативного тканеспецифического промотора L, тогда как количество мРНК убиквитарной изоформы Oct-1A практически не изменяется. Этот эффект дозозависимый и проявляется на уровне концентраций, применяемых в клинической практике. При концентрации 5-азациитидина 10 μM в культуральной среде количество мРНК Oct-1L в клетках Namalwa снижалось в три раза по сравнению с контролем, а при концентрации 5 μM — в два раза. Дальнейшее понижение концентрации 5-азациитидина не вызывало достоверных изменений в экспрессии Oct-1L.

Относительное содержание мРНК

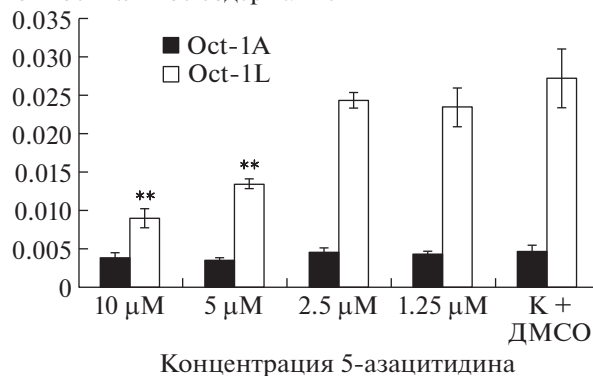


Рис. 2. Влияние 5-азациитидина на транскрипцию с альтернативных промоторов U и L гена POU2F1(Oct-1). Результаты количественной ПЦР. На диаграмме представлено среднее значение \pm S.E.M. для трех независимых экспериментов; t-тесты были выполнены, чтобы определить, существует ли значимая разница между средними значениями для контрольных и обработанных клеток (** $p < 0.01$).

Из представленных результатов видно, что 5-азациитидин подавляет транскрипцию с тканеспецифического промотора L, снижая концентрацию тканеспецифических изоформ в опухолевых клетках, но практически не влияет на транскрипцию с убиквитарного промотора U и концентрацию мРНК убиквитарной изоформы А.

В низких концентрациях, которые применяются в настоящее время в онкогематологической практике, 5-азациитидин является гипометилирующим агентом, который ингибирует ДНК-метилтрансферазу путем включения в ДНК азациитидинтрифосфата. Это приводит к потере метилирования ДНК и реактивации репрессированных генов. Считается, что патологические паттерны метилирования ДНК определяют развитие миелодиспластических синдромов высокого риска и острого миелоцитарного лейкоза, а гипометилирование может восстанавливать нормальную функцию генов, контролирующую дифференцировку и пролиферацию [15–17]. После 16 лет клинического применения 5-азациитидина он остается основным препаратом для лечения МДС и ОМЛ. Однако точный механизм его действия все еще до конца не изучен [17]. В нашей работе было показано, что 5-азациитидин подавляет транскрипцию с тканеспецифического L-промотора гена POU2F1 и избирательно снижает экспрессию изоформы Oct-1L в два-три раза при концентрациях, используемых в клинической практике.

Мы провели анализ области альтернативного промотора L гена POU2F1 и не обнаружили там CpG-островков, которые могли бы подвергаться метилированию, поэтому мы полагаем, что обнаруженный нами эффект 5-азациитидина не связан

с деметилированием промотора L. Возможно, деметилированию подвергаются более отдаленные участки гена POU2F1, регулирующие транскрипцию тканеспецифического промотора, или проявляются другие свойства 5-азацитидина, не связанные с деметилированием.

При лечении онкологических заболеваний следует обратить внимание на следующие факты: 1) высокий уровень экспрессии Oct-1 осложняет течение заболевания при таких гематологических опухолях, как ОМЛ, диффузная В-крупноклеточная лимфома, лимфома Ходжкина, лимфома тимуса; 2) искусственно вызванная гипоксепрессия Oct-1 при ОМЛ задерживает развитие лейкоза; 3) в В- и Т-клеточных лимфомах (линии клеток Namalwa, Raji, Jurkat) наблюдается аномально высокая экспрессия изоформы Oct-1L, нехарактерная для нормальных лимфоидных клеток; 4) в некоторых опухолевых линиях клеток уровень экспрессии изоформы Oct-1L значительно превышает таковой у нормальных клеток того же происхождения [18]. Из совокупности этих данных можно сделать вывод, что aberrантная экспрессия тканеспецифической изоформы Oct-1L является фактором неблагоприятного прогноза и может стать терапевтической мишенью для опухолей, в которых наблюдается высокий уровень Oct-1. В этих случаях возможно применение в комбинированной терапии 5-азацитидина, избирательно подавляющего экспрессию изоформы Oct-1L. Это предположение требует дальнейшего анализа экспрессии изоформ Oct-1 в первичных опухолях.

Из клинической практики известно, что монотерапия 5-азацитидином эффективна при лечении МДС и ОМЛ. Однако в настоящее время нет достаточных доказательств в поддержку применения 5-азацитидина при лечении солидных опухолей или других гематологических злокачественных новообразований. Единственная попытка применения 5-азацитидина для лечения солидных опухолей была предпринята в 1977 г. Противоопухолевый эффект наблюдался только у 17% обследованных пациентов с карциномой груди и у 21% пациентов со злокачественными лимфомами. В результате был сделан вывод, что препарат неэффективен при солидных опухолях [15]. Однако исследования последних лет показали, что опухоли следует разделять по уровню экспрессии Oct-1. Сверхэкспрессия Oct-1 коррелирует с агрессивностью опухоли при раке груди, пищевода, желудка, простаты, легких, головы и шеи, шейки матки, колоректального рака, диффузной В-крупноклеточной лимфомы и других злокачественных опухолей [1, 8]. Возможно, положительный противоопухолевый эффект 5-азацитидина в исследовании 1977 г. наблюдался именно у пациентов со сверхэкспрессией Oct-1L в опухоли.

Наши результаты подтверждают важность детального анализа экспрессии генов как стратегии выявления новых биомаркеров и терапевтических мишеней при лимфомах и лейкозах. Способность 5-азацитидина подавлять экспрессию Oct-1L в опухолевых клетках может стать важным шагом для его применения при лечении опухолей с повышенным уровнем экспрессии Oct-1L.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vázquez-Arreguín K., Tantin D.* The Oct1 transcription factor and epithelial malignancies: Old protein learns new tricks // *Biochim Biophys Acta.* 2016. V. 1859. № 6. P. 792–804.
2. *Maddox J., Shakya A., South S., et al.* Transcription factor Oct1 is a somatic and cancer stem cell determinant // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. P. e1003048.
3. *Shakya A., Goren A., Shalek A., et al.* Oct1 and OCA-B are selectively required for CD4 memory T cell function // *J. Exp. Med.* 2015. V. 212. P. 2115–2131.
4. *Shakya A., Cooksey R., Cox J.E., Wang V., McClain D.A., Tantin D.* Oct1 loss of function induces a coordinate metabolic shift that opposes tumorigenicity // *Nat Cell Biol.* 2009. V. 11. № 3. P. 320–327.
5. *Порцева Т.Н., Панкратова Е.В., Степченко А.Г., Георгиева С.Г.* Повышение уровня белка OCT-1 в опухолевых клетках модулирует клеточный ответ на противоопухолевые препараты // *ДАН.* 2016. Т. 469. С. 366–370.
6. *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.
7. *García-Cosío M., Santón A., Martín P., et al.* Analysis of transcription factor OCT.1, OCT.2 and BOB.1 expression using tissue arrays in classical Hodgkin's lymphoma // *Mod Pathol.* 2004. V. 17. № 12. P. 1531–1538.
8. *Gouveia G.R., Ferreira S.C., Siqueira S.A.C., et al.* Overexpression of OCT-1 gene is a biomarker of adverse prognosis for diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): data from a retrospective cohort of 77 Brazilian patients. // *BMC Cancer.* 2020. V. 20. № 1. P. 1041.
9. *Jafek J.L., Shakya A., Tai P.Y., et al.* Transcription factor Oct1 protects against hematopoietic stress and promotes acute myeloid leukemia. // *Exp Hematol.* 2019. V. 76. P. 38–48.e2.
10. *Сытина Е.В., Панкратова Е.В.* Фактор транскрипции Oct-1 – пластичность и полифункциональность. // *Молекулярная биология.* 2003. Т. 37 № 5. С. 755–767.
11. *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.
12. Pankratova E.V., Deyev I.E., Zhenilo S.V., Polanovsky O.L. Tissue-specific isoforms of the ubiquitous transcription factor Oct-1 // *Mol Genet Genomics.* 2001. V. 266. № 2. P. 239–245.
 13. 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. № 52. P. 29892–29905.
 14. Stepchenko A.G., Lyanova B.M., Krylova I.D., Ilyin Y.V., Georgieva S.G., Pankratova E.V. Differentiation of Monocytic Cells Is Accompanied by a Change in the Expression of the Set of Oct-1 Isoforms // *Dokl Biochem Biophys.* 2018. V. 483. P. 306–308.
 15. Семочкин С.В., Толстых Т.Н., Румянцев А.Г. Миелодиспластические синдромы: терапевтические проблемы и решения // *Онкогематология.* 2012. Т. 2. С. 57–66.
 16. Овечкина В.Н., Бондаренко С.Н., Морозова Е.В., Слесарчук О.А., Смирнова А.Г., Екушев К.А., Зубаровская Л.С., Афанасьев Б.В. Эффективность и безопасность применения 5-азациитидина после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при остром миелобластном лейкозе и миелодиспластическом синдроме. // *Клеточная терапия и трансплантация* 2015. Т. 5. С. 71.
 17. Kordella C., Lamprianidou E., Kotsianidis I. Mechanisms of Action of Hypomethylating Agents: Endogenous Retroelements at the Epicenter. // *Front Oncol.* 2021. V. 11. P. 650473.
 18. 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. № 3. P. 237–241.

5-AZACYTIDINE SUPPRESSES THE EXPRESSION OF TISSUE-SPECIFIC OCT-1 ISOFORM IN NAMALWA BURKITT'S LYMPHOMA CELL CULTURE

A. P. Kotnova^{a,#}, A. G. Stepchenko^a, Academician of the RAS Yu. V. Ilyin^a,
Corresponding Member of the RAS S. G. Georgieva^a, and E. V. Pankratova^a

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

[#]*e-mail: alina_kotnova@mail.ru*

Overexpression of the transcription factor POU2F1 (Oct-1) increases the malignant potential of the tumor and determines the unfavorable prognosis for both solid and hematological cases of the disease in human carcinogenesis. The Oct-1 level determines the rate of development of the disease in acute myelodysplastic leukemia (AML), and a decrease in its expression significantly delays the development of leukemia in mice; however, a complete knockout of Oct-1 leads to the death of the animals. POU2F1 (Oct-1) is expressed as several isoforms transcribed from alternative promoters. They include both ubiquitous and tissue-specific isoforms. It was shown that in Burkitt's lymphoma Namalwa cells 5-azacytidine specifically suppresses the expression of the tissue-specific isoform Oct-1L mRNA (level of Oct-1L is abnormally increased in these cells), while not causing changes in the amount of the ubiquitous isoform Oct-1A mRNA. These results show that it is possible to selectively reduce the transcription level of the Oct-1L isoform aberrantly expressed in human tumor cells.

Keywords: transcription factor POU2F1 (Oct-1), alternative promoters, 5-azacytidine, Burkitt's lymphoma