

Влияние доксорубицина на уровень экспрессии целевых генов арил-гидрокарбонового рецептора в культурах клеток человека

Ю. Е. Воронцова*, Р. О. Черезов, О. Б. Симонова

*Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН
Россия, 119334 г. Москва, улица Вавилова, 26.*

**Email: vjul83@mail.ru*

В данной работе было исследовано действие цитостатического препарата доксорубицина, обладающего противоопухолевой активностью, на уровень экспрессии целевых генов арил-гидрокарбонового рецептора *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B* в клеточных культурах человека опухолевого и неопухолевого происхождения. Показано отсутствие заметного действия доксорубицина на уровень их экспрессии.

Ключевые слова: арил-гидрокарбоновый рецептор АНР, доксорубицин, *CYP1*, культура клеток.

Арил-гидрокарбоновый рецептор (Aryl Hydrocarbon Receptor, АНР), важный лиганд-зависимый транскрипционный фактор, широко представлен у многих видов животных и человека. Роль лигандов АНР могут выполнять агенты, как эндогенного (естественного), так и экзогенного (ксенобиотики) происхождения [1]. Известно, что гены-мишени АНР контролируют клеточный цикл, дифференцировку нервных, иммунных и генеративных клеток, а также участвуют в детоксикации клеток. В течение нескольких десятков лет подробно изучается роль АНР в ответе на токсичное воздействие ксенобиотиков и в процессах канцерогенеза [2, 3].

Доксорубицин – цитостатический препарат, один из антрациклиновых антибиотиков, известный с конца 1960-х годов, обладает эффективной противоопухолевой активностью и часто применяется в химиотерапии злокачественных опухолей. Как и многие ксенобиотические лиганды АНР, включая диоксин (2,3,7,8-тетрахлордибензо-*p*-диоксин, ТХДД), доксорубицин относится к ряду полиароматических углеродородов. В недавней работе [4] было показано, что воздействие доксорубицина активирует АНР, что приводило к инициации транскрипции его генов-мишеней *CYP1A1* и *GSTA1*. Эта работа проводилась на культуре кардиомиобластов эмбрионов крысы Н9С2 и культуре вентрикулярных миоцитов взрослых крыс ARVM, а также *in vivo* с использованием линии мышей с ноль мутацией по АНР. Однако, как влияет доксирубицин на уровень экспрессии целевых генов АНР в других клеточных линиях, остается неисследованным.

Целью нашей работы было изучение действия доксорубина на активность генов-мишеней АНР, в клеточных культурах человека неопухолевого (НЕК293, клетки эмбриональных почек человека; MSC, мезенхимальные стволовые клетки) и опухолевого (PC3, аденокарцинома простаты; Sus\fp2, глиобластома человека) происхождения. Все клеточные культуры любезно предоставлены сотрудниками лаборатории нейрогенетики и генетики развития ИБГ РАН [5]. В качестве генов-мишеней АНР были выбраны гены, кодирующие ферменты оксидативного стресса семейства цитохрома 450: *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B*. Доксорубин ("Sigma Aldrich") добавляли в конечной концентрации 4 мкМ к клеточной среде DMEM/F12 ("Gibco"). Клетки инкубировали в течение 24 ч. Тотальную РНК выделяли с помощью RNazol ("Molecular Research Center") согласно протоколу фирмы производителя, обратную транскрипцию проводили с помощью набора реактивов MMLV RT Kit ("Евроген"), ПЦР в реальном времени – с помощью набора реактивов qPCRmix-HS SYBR+HighRox ("Евроген"). Реакцию ставили в ампликаторе Applied Biosystems 7500. Условия амплификации: 95° – 5 мин, затем 40 циклов (95° – 15 с, 60° – 15 с, 72° – 30 с). Нормализацию результатов проводили по экспрессии гена *GAPDH*. Уровень экспрессии генов оценивали по значению $R = \Delta\Delta Ct$, т.е. через отношение экспрессии целевого гена к гену домашнего хозяйства *GAPDH*. Использовали следующие последовательности пар праймеров: для гена *GAPDH* – прямой: *TGCACCACCAACTGCTTAGC*, обратный: *GGCATGGACTGTGGTCATGAG*, для гена *CYP1A1* – прямой: *GATTGAGCACTGTCAGGAGAAGC*, обратный: *CCAAAGAGGTCCAAGACGATGTТА*, для гена *CYP1A2* – прямой: *ATCCTGGAGACSTTCGACACT*, обратный: *GATGTAGAA-GCCATTСAGCGTTGTG*, для гена *CYP1B* – прямой: *СТСААССGCAACTTCAGCAACTTC*, обратный: *AGAGAGGATAAAGGCGTCCATCAT*.

На культурах клеток человека как неопухолевого (НЕК293, MSC), так и опухолевого (PC3, Sus\fp2) происхождения, с помощью ПЦР в реальном времени мы провели сравнительный анализ уровня экспрессии мРНК трех генов-мишеней арил-гидрокарбонового рецептора (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B*) до (контроль) и после добавления доксорубина. К нашему удивлению, только в одной опухолевой культуре глиобластомы человека Sus\fp2 было небольшое (в 2.5–3.5 раза) увеличение экспрессии генов *CYP1A1* и *CYP1A2* по сравнению с контрольными клетками (без доксорубина) (рис. 1), а в остальных тестируемых культурах клеток уровень экспрессии исследованных целевых генов оставался практически неизменным или понижался. При этом экспрессия этих же генов после добавления других известных экзогенных лигандов АНР (индол-3-карбинол, индирубин) в данные культуры существенно (в 20 раз) повышалась (Воронцова и др., не опубл.).

Возможно, показанная ранее [4] активация арил-гидрокарбонового рецептора с помощью доксорубина характерна только для клеток сердечной мышцы (кардиомиобластов и миоцитов), а в других клетках действует иной механизм, независимый от АНР пути. Недавно на дрозофиле было показано, что тканеспецифическая актива-

ция генов-мишеней АНР человека зависит от их эпигенетического статуса [6]. Возможно, различный эффект действия доксорубина на активацию целевых генов АНР в культурах клеток человека в какой-то мере также зависит и от статуса хроматина (открытый/закрытый) их регуляторных районов.

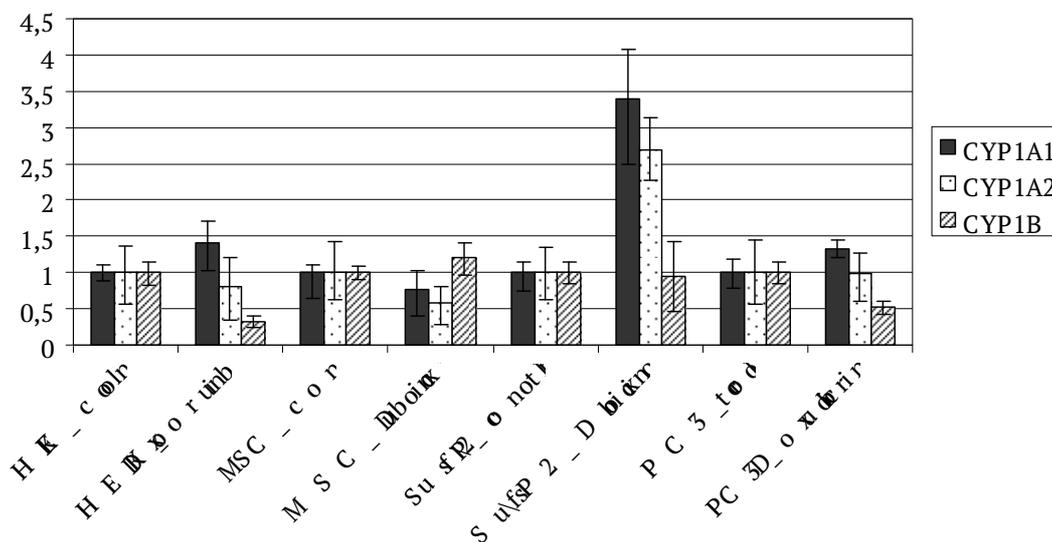


Рис. 1. Уровень экспрессии генов-мишеней арил-гидрокарбонowego рецептора *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B* в клеточных культурах до (контроль) и после добавления доксорубина. На оси ординат представлено значение $R = 2\Delta Ct$, т.е. отношение количества мРНК целевого гена к количеству мРНК гена домашнего хозяйства *GAPDH*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00162 мол-а и раздела Государственного задания ИБР РАН № 0108-2018-0001.

Литература

1. Denison M., Nagy S. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2003. Vol. 43. Pp. 309–334.
2. Fukunaga B., Probst M., Reisz-Porszasz S., Hankinson O. Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. No 49. Pp. 29270–29278.
3. Jin U., Karki K., Kim S., Safe S. Inhibition of pancreatic cancer Panc1 cell migration by omeprazole is dependent on aryl hydrocarbon receptor activation of JNK // *Biochem Biophys Res Commun.* 2018. Vol. 501. No 3. Pp. 751–757.
4. Volkova M., Palmeri M., Russell K., Russell R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by doxorubicin mediates cytoprotective effects in the heart // *Cardiovascular Research.* 2011. Vol. 90. Pp. 305–314.

5. Pustogarov N., Panteleev D., Goryaynov S., Ryabova A., Rybalkina E., Revishchin A., Potapov A., Pavlova G. Hiding in the shadows: CPOX expression and 5-ALA induced fluorescence in human glioma cells // *Mol Neurobiol*. 2017. Vol. 54. Pp. 5699–5708.
6. Akishina A., Vorontsova J., Cherezov R., Mertsalov I., Zatsepina O., Slezinger M, Panin V., Petruk S., Enikolopov G., Mazo A., Simonova O., Kuzin B. Xenobiotic-induced activation of human Aryl hydrocarbon receptor target genes in *Drosophila* is mediated by the epigenetic chromatin modifiers // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8. No. 61. Pp. 102934–102947.

Статья рекомендована к печати научным советом Института биологии развития
им. Н. К. Кольцова РАН.

The effect of doxorubicin on Aryl hydrocarbon receptor target genes' expression in human cell cultures

Yu. E. Vorontsova*, R. O. Cherezov, O. B. Simonova

*Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences
26 Vavilov Street, 119334 Moscow, Russia.*

**Email: vjul83@mail.ru*

In this paper the effect of cytostatic drug doxorubicin, which has anti-tumor activity, on the expression level of the aryl-hydrocarbyl receptor target genes CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B in human cell cultures of tumor and non-tumor origin was studied. It was shown that there is no noticeable effect of doxorubicin on the level of their expression.

Keywords: aryl-hydrocarbon receptor AHR, doxorubicin, CYP1, cell culture.