

УДК 577.218

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ ОТВЕТА НА КСЕНОБИОТИКИ (XRE) В СОСТАВЕ ГЕНА *CYP1A1* ЧЕЛОВЕКА ПОВЫШАЮТ АКТИВНОСТЬ ПРОМОТОРА hTERT

М. В. Шепелев*, С. В. Калининченко, Е. К. Саакян, И. В. Коробко

Представлено академиком РАН Г.П. Георгиевым 30.11.2018 г.

Поступило 30.11.2018 г.

Создали гибридный промотор 6XRE–hTERT, состоящий из опухолеспецифического промотора hTERT и шести копий элементов XRE из промотора гена *CYP1A1* человека. На модели клеток рака лёгких человека показали, что элементы XRE в составе гибридного промотора существенно повышают активность промотора hTERT и обеспечивают активацию транскрипции репортёрного гена в ответ на обработку клеток лигандом AhR бенз(а)пиреном. Однако сходные эффекты были обнаружены и в клетках нормального эпителия бронхов человека линии HBEpC, что свидетельствует об утрате опухолеспецифической активности гибридным промотором 6XRE–hTERT. Элементы XRE могут быть использованы для неспецифического усиления транскрипции, но непригодны для создания опухолеспецифических промоторов с повышенной активностью.

Ключевые слова: элементы ответа на ксенобиотики (XRE), промотор hTERT, гибридный промотор 6XRE–hTERT.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524855634-637>

Генная терапия является перспективным подходом к лечению онкологических заболеваний, а её успех во многом зависит от эффективной и специфической экспрессии терапевтического трансгена в опухолевых клетках. Для обеспечения специфичности экспрессии трансгена часто используют опухолеспецифические промоторы [1]. В частности, промотор гена обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT) активен в опухолях, что обеспечивает возможность воздействия на опухолевые клетки разного происхождения [1, 2]. Однако промотор hTERT достаточно слабый, что может повлиять на эффективность генной терапии. В работах [3, 4] было показано, что слияние с синтетическим ТАТА-боксом или с минимальным промотором цитомегаловируса (CMV) увеличивает активность промотора hTERT. Однако активность этого промотора сильно варьируется в зависимости от происхождения опухолевых клеточных линий, что нивелирует преимущество его универсальности [5]. Всё это определяет необходимость поиска новых подходов к повышению активности промотора hTERT в опухолевых клетках с сохранением его опухолевой специфичности.

Один из таких подходов состоит в использовании *цис*-действующих генетических элементов, активируемых опухолеспецифическими молекулярными процессами. Валидность такого подхода была показана нами на примере повышения активности промотора hTERT без потери опухолевой специфичности транскрипции трансгена при комбинации промотора с *цис*-действующими элементами антиоксидантного ответа (ARE) [6].

В настоящей работе для выявления новых *цис*-действующих элементов для применения в генетических конструкциях при генной терапии опухолей мы исследовали способность элементов ответа на ксенобиотики (XRE, xenobiotic response element) повышать активность промотора hTERT за счёт повышенной экспрессии AhR (арил-гидрокарбонный рецептор) в широком спектре опухолей.

Элементы XRE находят в промоторах генов, кодирующих ферменты системы детоксикации, например белки семейства цитохромов P450. Ксенобиотики — ароматические углеводороды, лекарственные средства, эндогенные метаболиты триптофана и другие соединения — выступают в качестве лигандов транскрипционного фактора AhR, входящего в семейство факторов с доменом PAS (PER/ARNT/SIM) из класса bHLH, и вызывают его активацию и перемещение в ядро, где AhR связывается с элементами XRE в промоторах генов-ми-

Институт биологии гена
Российской Академии наук, Москва
*E-mail: mshepelev@mail.ru

шеней и активирует их транскрипцию [7]. Для многих опухолей человека характерны повышенная экспрессия и эктопическая активация AhR, которые способствуют прогрессии опухолевого роста [7].

Консенсусная последовательность элементов ХРЕ состоит из 10 п.н. — 5'-(Т/Г)NGCGTG(A/C)(G/C)A-3', включая коровую последовательность 5'-GCGTG-3'. Промотор гена *CYP1A1* мыши содержит восемь элементов ХРЕ [8], а наибольшую индукцию транскрипции репортёрного гена при обработке клеток лигандами AhR обеспечивает элемент ХРЕ4 [8], который идентичен у мыши и человека. Максимальная активация репортёрного гена отмечается при прямой ориентации коровой последовательности 5'-GCGTG-3' в промоторе и использовании в позиции N нуклеотидов Т или С [8]. Учитывая это, для использования в составе гибридного промотора мы выбрали последовательность ХРЕ4 длиной 25 п.н. из промотора гена *CYP1A1* человека (–995/–971 п.н. относительно сайта начала транскрипции), которая была расположена в гибридном промоторе в обратной ориентации.

Плазмиды, несущие кДНК репортёрного гена люциферазы под контролем двух (p2ХРЕ), четырёх (p4ХРЕ) и шести (p6ХРЕ) копий элементов ХРЕ, создавали на основе вектора pGL3-Basic ("Promega", США), последовательно клонируя по сайтам KpnI-SacI двухцепочечные олигонуклеотиды, полученные путём отжига одноцепочечных комплементарных олигонуклеотидов 5'-ccggagctcgcccaggcgttgcgtgagaaggacctgcccaggcgttgcgtgagaaggaccagct-3' и 5'-gggtccttctcaagcaagcctgggcaggtccttctcaagcaagcctgggcagctccgggtac-3' (полужирным шрифтом выделена консенсусная последовательность ХРЕ). Плазмиды, несущие кДНК люциферазы под контролем гибридного промотора (состоит из промотора hTERT и двух (p2ХРЕ–hTERT), четырёх (p4ХРЕ–hTERT) и шести (p6ХРЕ–hTERT) копий элементов ХРЕ), получали путём клонирования промотора hTERT из плазмиды rhTERT–Luc [5] по сайтам XhoI-HindIII в 3'-область относительно элементов ХРЕ в плазмиды p2ХРЕ, p4ХРЕ и p6ХРЕ соответственно.

Анализ активности репортёрных плазмид проводили в клетках линий рака лёгких человека NCI-H1299, Calu-1, A549 и NCI-H358 и в клетках нормального бронхиального эпителия человека HBEpC, которые культивировали, как описано ранее [6]. Клетки трансфицировали с использованием реагента для трансфекции EctoTransfect ("OZ Bioscience", Франция) указанными репортёрными плаزمидами и для нормализации сигнала люминесценции —

плазмидой pRL-ТК ("Promega"), экспрессирующей люциферазу Renilla. Через 72 ч после трансфекции измеряли активность люциферазы в лизатах клеток с помощью набора реагентов Dual-Luciferase Reporter Assay System ("Promega").

В клетках линии NCI-H1299 мы выявили по сравнению с безпромоторной плазмидой pGL3-Basic более высокий уровень активности люциферазы, экспрессирующейся под контролем элементов ХРЕ, и пропорциональный числу копий элементов ХРЕ в плаزمиде (рис. 1). Также мы обнаружили повышение активности промотора hTERT пропорционально числу элементов ХРЕ в гибридном промоторе по сравнению с немодифицированным промотором, которая достигала максимума при комбинации промотора hTERT и шести копий ХРЕ (p6ХРЕ–hTERT, активация в 2,15 раза по сравнению с phTERT, рис. 1).

Для дальнейшего анализа мы выбрали промотор 6ХРЕ–hTERT и сравнили его активность с таковой промотора hTERT в других клеточных линиях рака лёгких человека. Мы обнаружили, что добавление шести копий элементов ХРЕ повышает активность промотора hTERT в 2,87 раза (клетки Calu-1, образцы rhTERT–BaP и p6ХРЕ–hTERT–BaP, рис. 2), и в 4,35 и 2,88 раза (клетки A549 и NCI-H358, данные не представлены).

Для подтверждения функциональной активности элементов ХРЕ клетки обрабатывали лигандом AhR — бенз(a)пиреном (BaP) — в концентрации 10 мкМ в течение 48 ч перед проведением люциферазного анализа. Обнаружили, что BaP активирует

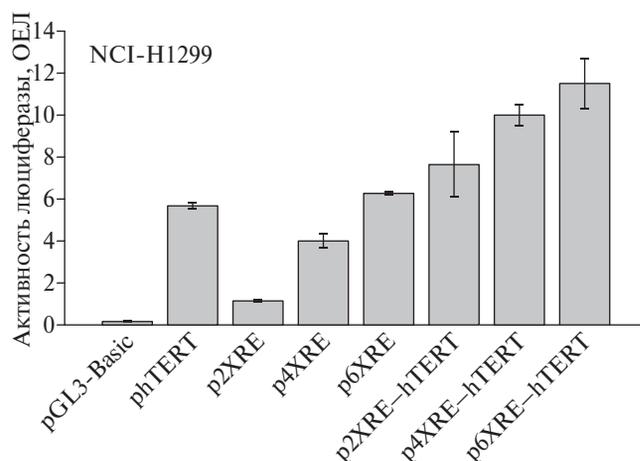


Рис. 1. Транскрипционная активность элементов ХРЕ и гибридных промоторов в клетках линии NCI-H1299. Здесь и на рис. 2 по оси ординат — активность люциферазы светлячка после нормализации на активность люциферазы Renilla в относительных единицах люминесценции (ОЕЛ); $M \pm SD$, $n = 3$.

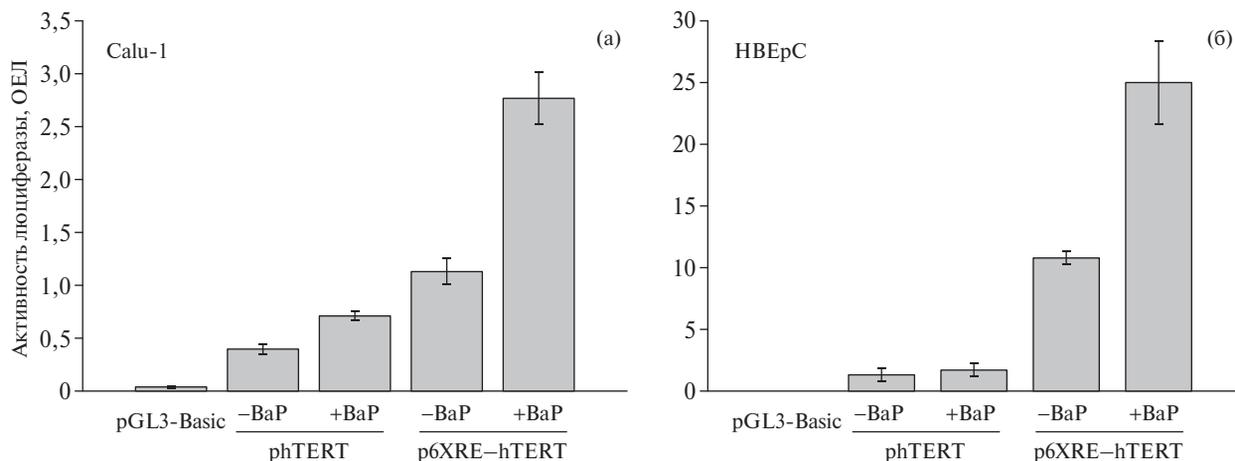


Рис. 2. Активность промоторов hTERT и 6XRE-hTERT в клетках Calu-1 (а) и HBEpC (б).

гибридный промотор 6XRE-hTERT в клетках Calu-1 в 2,44 раза (рис. 2а) и в клетках A549 и NCI-H358 (данные не представлены) — в 3,0 и 2,06 раза соответственно. Также BaP активировал и немодифицированный промотор hTERT в клетках линий Calu-1 в 1,79 раза (рис. 2а) и линий A549 и NCI-H1299 (данные не представлены) в 2,45 и 1,65 раза соответственно. Это может быть обусловлено способностью AhR активировать промотор TERT [9].

Анализа активности промоторов в неопухолевых клетках HBEpC показал, что, как и в опухолевых клетках, активность промотора 6XRE-hTERT существенно выше по сравнению с промотором hTERT (в 9,41 раза), и гибридный промотор активируется в 2,32 раза после обработки клеток BaP, но при этом не выявляется активация промотора hTERT под влиянием BaP (рис. 2б).

Таким образом, мы установили, что *цис*-действующие элементы XRE из промотора гена *CYP1A1* человека обладают высокой транскрипционной активностью, обеспечивают активацию транскрипции репортёрного гена в ответ на обработку клеток лигандом AhR и в составе гибридного промотора существенно повышают активность промотора hTERT. Однако при этом не сохраняется опухолевая специфичность, что делает элементы XRE непригодными для создания опухолеспецифических промоторов

с повышенной активностью. Элементы XRE могут использоваться для повышения уровня активности промотора без селективности по отношению к опухолевым клеткам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Das S.K., Menezes M.E., Bhatia S., Wang X.Y., Em-dad L., Sarkar D., Fisher P.B. // J. Cell Physiol. 2015. V. 230. P. 259–271.
2. Fujiwara T., Urata Y., Tanaka N. // Curr. Cancer Drug Targets. 2007. V. 7. P. 191–201.
3. Wirth T., Zender L., Schulte B., Mund B., Plentz R., Rudolph K.L., Manns M., Kubicka S., Kuhnel F. // Cancer Res. 2003. V. 63. P. 3181–3188.
4. Davis J.J., Wang L., Dong F., Zhang L., Guo W., Terai-shi F., Xu K., Ji L., Fang B. // Cancer Gene Ther. 2006. V. 13. P. 720–723.
5. Shepelev M.V., Kopantzev E.P., Vinogradova T.V., Sverdlov E.D., Korobko I.V. // Oncol. Lett. 2016. V. 12. P. 1204–1210.
6. Калиниченко С.В., Шепелев М.В., Вухрева П.Н., Коробко И.В. // Acta Naturae. 2017. Т. 9. С. 66–73.
7. Murray I.A., Patterson A.D., Perdew G.H. // Nat. Rev. Cancer. 2014. V. 14. P. 801–814.
8. Li S., Pei X., Zhang W., Xie H.Q., Zhao B. // Int. J. Mol. Sci. 2014. V. 15. P. 6475–6487.
9. Sarkar P., Shiizaki K., Yonemoto J., Sone H. // Int. J. Oncol. 2006. V. 28. P. 43–51.

**XENOBIOTIC RESPONSE ELEMENTS (XRE) FROM HUMAN
CYP1A1 GENE ENHANCE THE hTERT PROMOTER ACTIVITY****M. V. Shepelev, S. V. Kalinichenko, E. K. Saakian, I. V. Korobko***Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

Presented by Academician of the RAS G.P. Georgiev November 30, 2018

Received November 30, 2018

A hybrid 6XRE–hTERT promoter consisting of the hTERT tumor-specific promoter and six copies of the XRE element from the *CYP1A1* human gene promoter was created. Using a human lung cancer cells as a model, we showed that XRE elements in the hybrid promoter greatly increase the activity of the hTERT promoter and ensure the reporter gene transcriptional activation in response to the treatment of the cells with the AhR ligand benzo(a)-pyrene. However, similar effects were also observed in normal human bronchial epithelial cells HBEpC, which indicates the loss of the tumor-specific activity by the 6XRE–hTERT hybrid promoter. XRE elements can be used for nonspecific transcription enhancement but are unsuitable for the creation of tumor-specific promoters with enhanced activity.

Keywords: xenobiotic response elements (XRE), hTERT promoter, 6XRE–hTERT hybrid promoter.