КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 576.36:57.016

**Функциональная активность арил-гидрокарбонового рецептора в первичных культурах клеток остеогенной саркомы человека**

**Ю.Е. Воронцова\*, А.А. Акишина, Р.О. Черезов, О.Б. Симонова**

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

\**e-mail: vorontsova@idbras.ru*

ORCID (Воронцова) https://orcid.org/0000-0002-3378-1515

ORCID (Акишина) https://orcid.org/0000-0002-3428-7287

**Остеогенная саркома** – агрессивная злокачественная опухоль костной ткани, возникающая в молодом возрасте (10–19 лет) и, как правило, заканчивающаяся фатально. Арил-гидрокарбоновый рецептор человека (**A**ryl **H**ydrocarbon **R**eceptor, AHR) – лиганд-зависимый транскрипционный фактор, который связан с детоксикацией ксенобиотиков и канцерогенезом. Известно, что некоторые лиганды AHR входят в состав фармацевтических препаратов, применяемых в онкотерапии. Однако в мировой литературе мало работ, посвященных исследованию последствий их воздействия на клетки остеосаркомы. В данной работе были получены три первичные культуры из биопсийного материала злокачественных опухолей костной ткани остеогенной саркомы человека. Было показано, что во всех полученных культурах AHR функционально активен, однако профиль активации экспрессии его генов-мишеней в ответ на действие лиганда варьировал.

**Ключевые слова**: *арил-гидрокарбоновый рецептор AHR, цитохромы P450 семейства CYP1, остеосаркома, индирубин, индол-3-карбинол, первичные культуры*

**Running title:** Функциональная активность AHR в культурах клеток остеогенной саркомы

**Остеогенная саркома, или остеосаркома** – первичная злокачественная опухоль, происходящая из костной ткани. Эти опухоли характеризуются быстрым прогрессирующим ростом, ранним метастазированием, частым возникновением рецидивов после оперативного лечения и заканчиваются, как правило, фатально. Остеосаркома чаще наблюдается у молодых пациентов, пик заболеваемости приходится на период быстрого роста: 10–14 лет у девочек и 15–19 лет у мальчиков [1]. Несмотря на большое количество проведенных исследований, направленных на оптимизацию режимов системной терапии сарком [2–4], эффективность терапии этих злокачественных новообразований остается низкой. Накопленные данные свидетельствуют о необходимости изучения факторов, влияющих на прогноз заболевания и результатов химиотерапии, а также поиска альтернативных методов лечения остеосарком.

Арил-гидрокарбоновый рецептор (**A**ryl **H**ydrocarbon **R**eceptor, AHR) – лиганд-зависимый транскрипционный фактор, который связан с детоксикацией ксенобиотиков и канцерогенезом. На данный момент известно большое количество соединений, которые могут выступать в качестве лиганда для AHR, среди них пищевые вещества, природные и синтетические флавоноиды, а также фармацевтические препараты, в том числе применяемые в онкотерапии [5–7].

В неактивном состоянии AHR существует в цитоплазме в мультипептидном комплексе c димером белка теплового шока HSP90 (**H**eat **S**hock **P**rotein 90), кошапероном p23 и белком AIP (**A**HR **I**nteracting **P**rotein). После связывания лиганда с AHR комплекс диссоциирует и AHR перемещается в ядро, где связывается с ядерным переносчиком AHR – ARNT (**A**ryl Hydrocarbon **R**eceptor **N**uclear **T**ranslocator) [8]. Образованный гетеродимер AHR:ARNT взаимодействует с регуляторными элементами *XRE* (**X**enobiotic **R**esponse **E**lement) генов-мишеней, что приводит к инициации их транскрипции [9–10].

Наиболее изученными мишенями AHR являются гены, кодирующие ферменты метаболизма ксенобиотиков, а именно – ферменты системы цитохрома P450 (cytochrome P450, CYP). В настоящее время известно, что во многих опухолевых клетках изменения соотношения различных изоформ CYP и их индуцибельности отличаются от таких изменений в неопухолевых клетках, и это может сильно влиять на эффективность лечения противоопухолевыми препаратами.

В настоящее время AHR рассматривают в качестве потенциальной мишени для противораковой терапии [5–7]. Несмотря на множество работ, посвященных изучению активности AHR при разных типах онкологических заболеваний, среди них мало исследований, касающихся его роли в злокачественных новообразованиях костей, в частности, при остеогенных саркомах. Целью нашей работы стало исследование функциональной активности AHR в первичных культурах клеток остеогенных сарком человека после воздействия на них его экзогенных лигандов.

**Материалы и методы**

***Получение первичных культур клеток остеогенной саркомы.*** Образцы опухолевой ткани были получены в 2018 г. из биопсийного материала больных с диагнозом «конвенциональная остеогенная саркома, остеобластический вариант». Пациенты мужского и женского пола в возрасте 14–16 лет, химиотерапевтического лечения до взятия биопсийного материала не проводилось. Опухолевые образцы транспортировали в лабораторию в течение 2–3 ч в бессывороточной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, ПанЭко, Россия) с добавлением 100 мкг/мл гентамицина (Микроген, Россия). Далее полученную ткань обрабатывали механически и ферментативно (раствор трипсина-ЭДТА 0,25%, ПанЭко, Россия) до получения клеточной суспензии, которую переносили во флаконы (Corning Costar, США) со средой DMEM/F12 (Gibco, Великобритания) c добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (PAA Laboratories, Австрия) и гентамицина (50 мкг/мл).

***Клеточные линии и условия культивирования*.** Линии клеток эмбриональной почки человека HEK293 и мезенхимальных стволовых клеток MSC культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, Великобритания) c добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (PAA Laboratories, Австрия) и гентамицина в концентрации 50 мкг/мл.

***Обработка клеток лигандами***. Первичные культуры клеток остеосаркомы рассевали на 6-луночные чашки и через сутки в клеточную среду добавляли лиганды с конечной концентрацией 100 нМ для индирубина (Sigma-Aldrich, США), 100 мкМ для индол-3-карбинола (Mirax Biopharma, Россия). Стоковые растворы лигандов были приготовлены с использованием ДМСО (диметилсульфоксид; ПанЭко, Россия). Соответствующее количество ДМСО было добавлено к контрольному образцу клеток. Клетки инкубировали с лигандами в течение 24 ч.

***Выделение РНК, ОТ-ПЦР и ПЦР в реальном времени*.** Тотальную РНК выделяли с помощью RNAzol RT reagent (Sigma-Aldrich, США) по протоколу производителя. Качество выделенной РНК проверяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле, содержащем 0,01% бромистого этидия. Концентрацию РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, США). Обратную транскрипцию проводили с помощью набора реактивов MMLV RT Kit (Евроген, Россия), ПЦР в реальном времени – с помощью набора реактивов qPCRmix-HS SYBR+HighRox (Евроген, Россия). Реакцию ставили в амплификаторе ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied BioSystems, США). Условия амплификации: 95° – 5 мин, затем 40 циклов (95° – 15 с, 60° – 15 с, 72° – 30 с). В качестве референсных генов использовали *GAPDH* и *HPRT1*. Уровень экспрессии генов оценивали методом 2-ΔΔСt. В работе использовали следующие последовательности пар праймеров: для гена *GAPDH*: прямой – *TGCACCACCAACTGCTTAGC*, обратный – *GGCATGGACTGTGGTCATGAG*; для гена *HPRT1*: прямой – *TGAGGATTTGGAAAGGGTGT*, обратный – *GAGCACACAGAGGGCTACAA*; для гена *CYP1A1*: прямой – *GATTGAGCACTGTCAGGAGAAGC*, обратный – *CCAAAGAGGTCCAAGACGATGTTA*; для гена *CYP1A2*: прямой – *ATCCTGGAGACCTTCCGACACT*, обратный – *GATGTAGAAGCCATTCAGCGTTGTG*; для гена *CYP1B*: прямой – *CTCAACCGCAACTTCAGCAACTTC*, обратный – *AGAGAGGATAAAGGCGTCCATCAT.* Для каждого образца было сделано три повтора. Статистическую значимость различий между образцами оценивали с помощью программного обеспечения REST (Qiagen, США) [16]. Значение p<0,05 считали значимым.

***Вестерн-блоттинг***. Общий клеточный белок выделяли в буфере по Лэммли (10% SDS, 50 мМ Tris-HCl pH 6,8, 25% глицерина, 0,05% бромфенолового синего и 6% 2-меркаптоэтанола). Белковый экстракт разделяли с помощью электрофореза в SDS-полиакриламидном геле в камере Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad, США) в соответствии с протоколом производителя, белки переносили на мембрану Hybond ECL (Sigma Aldrich, США). Мембрану инкубировали в буфере TBS-T (10 мМ Tris-HCl pH 7,4, 150 мМ NaCl и 0,1% Tween 20), содержащем 2% BSA, в течение 1 ч, а затем инкубировали с первичными антителами при 4°С в течение ночи (против AHR – D5S6H, Cell Signaling Techlonogy, США, 1:7000; против GAPDH – ab9385, Abcam, Великобритания, 1:10000). После этого мембрану отмывали в буфере TBS-T 3 раза по 20 мин и инкубировали со вторичными антителами (С1313, Santa Cruz, США, 1:12000) в течение 2 ч при комнатной температуре. Иммунокомплексы выявляли с помощью набора реактивов ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Sigma Aldrich, США).

**Результаты и обсуждение**

Были получены три первичные культуры из биопсийного материала злокачественных опухолей костной ткани остеогенной саркомы человека (O.src 25/16, O.src 17/18, O.src 20/18). Во всех культурах остеосаркомы было обнаружено повышенное содержание белка AHR по сравнению с неопухолевыми клетками HEK293 и MSC (рис. 1).

Также мы сравнили исходный уровень экспрессии генов *CYP* в культурах клеток остеосаркомы без активации AHR лигандами. Самый высокий уровень экспрессии гена *CYP1A1* наблюдался в культуре O.src20/18, гена *CYP1A2* – в O.src17/18, а гена *CYP1B* – в культуре O.src25/16 (рис. 2)**.**

Функциональная активность AHR оценивалась по изменению экспрессии генов семейства 1 цитохрома P450 (*CYP1A1, CYP1A2, CYP1B*) после воздействия на клетки его известных экзогенных лигандов – индирубина и индол-3-карбинола.

В наших сравнительных экспериментах мы обнаружили, что в большинстве случаев AHR функционально активен как лиганд-зависимый транскрипционный фактор генов-мишеней семейства *CYP* в первичных культурах клеток остеосаркомы. Интересно, что гены-мишени одного семейства цитохромов Р450, участвующие в процессах метаболизма, по-разному реагировали на воздействие лиганда в пределах одной культуры клеток. Также была различна интенсивность активации одного и того же гена разными лигандами.

Возможно, последствия активации AHR в культурах остеогенных сарком зависят от дополнительных факторов, например, от эпигенетического статуса его целевых генов и наличия неизвестных эндогенных лигандов, что требует дальнейшего исследования.

Работа выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН 2020 года № 0108-2019-0001. Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с человеческим материалом, установленными этической комиссией Института биологии развития имени Н.К Кольцова РАН. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Amankwah E.K., Conley A.P. Reed D.R. Epidemiology and therapies for metastatic sarcoma. *Clin. Epidemiol.* 2013;5:147–162.

2. Ritter J., Bielack S.S. Osteosarcoma. *Ann. Oncol.* 2010;21(Suppl. 7):320–325.

3. Hattinger C.M., Serra M. Role of pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes in treating osteosarcoma. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2015;11(9):1449–1463.

4. Byrgazov K., Anderson C., Salzer B., Bozsaky E., Larsson R., Gullbo J., Lehner M., Lehmann F., Slipicevic A., Kager L., Fryknäs M., Taschner-Mandl S. Targeting aggressive osteosarcoma with a peptidase-enhanced cytotoxic melphalan flufenamide. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 2020;12:e1758835920937891.

5. Vorontsova J.E., Cherezov R.O., Kuzin B.A., Simonova O.B. Aryl-hydrocarbon receptor as a potential target for anticancer therapy. *Biochem. (Mosc.), Suppl., Ser. B Biomed. Chem.* 2019;13(1):36–54.

6. Feng S., Cao Z., Wang X. Role of aryl hydrocarbon receptor in cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013;1836(2):197–210.

7. Safe S., Jayaraman A., Chapkin R.S. Ah receptor ligands and their impacts on gut resilience: structure-activity effects. *Crit. Rev. Toxicol.* 2020;50(6):463–473.

8. Pollenz R.S., Barbour E.R. Analysis of the complex relationship between nuclear export and aryl hydrocarbon receptor-mediated gene regulation. *Mol. Cell Biol.* 2000;20(16):6095–6104.

9. Nebert D.W., Roe A.L., Dieter M.Z., Solis W.A., Yang Y., Dalton T.P. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 2000;59(1):65–85.

10. Beischlag T.V., Luis Morales J., Hollingshead B.D., Perdew G.H. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2008;18(3):207–250.

Поступила в редакцию 31.08.2020 г.

После доработки 27.09.2020 г.

Принята в печать 09.10.2020 г.

SHORT COMMUNICATION

**Functional activity of aryl hydrocarbon receptor in human osteosarcoma cell cultures**

**Yu.E. Vorontsova\*, A.A. Akishina, R.O. Cherezov, O.B. Simonova**

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

\**e-mail: vorontsova@idbras.ru*

ORCID (Vorontsova) 0000-0002-3378-1515

ORCID (Akishina) 0000-0002-3428-7287

Osteosarcoma is the most prevalent bone malignant tumor with a high mortality rate among children and adolescents. The aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a ligand-dependent transcription factor associated with xenobiotic detoxification and carcinogenesis. It is known that some AHR ligands are included in the composition of drugs used in cancer therapy. However there are few works devoted to the study of their effect on osteosarcoma cells. In this work, three primary cell cultures were obtained from biopsy material of malignant bone tumors of human osteosarcoma. It was shown that the aryl-hydrocarbon receptor is functionally active in all cultures, but the target genes were induced differently by ligand treatment within the same cell culture.

**Keywords**: *aryl hydrocarbon receptor AHR,* *cytochrome P450 family CYP1, osteosarcoma, indirubin, indol-3-carbinol, cell culture*

**Сведения об авторах**

*Воронцова Юлия Евгеньевна* – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории молекулярно-генетических процессов развития Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Тел: 8-499-135-20-97; e-mail: vorontsova@idbras.ru; ORCID: 0000-0002-3378-1515

*Акишина Ангелина Александровна* – мл. науч. сотр. лаборатории молекулярно-генетических процессов развития Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Тел: 8-499-135-20-97; e-mail: ilitiri@bk.ru; ORCID: 0000-0002-3428-7287

*Черезов Роман Олегович* – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории молекулярно-генетических процессов развития Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Тел: 8-499-135-20-97; e-mail: ro-tcherezov@yandex.ru

*Симонова Ольга Борисовна* – докт. биол. наук, зав. лабораторией молекулярно-генетических процессов развития Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Тел: 8-499-135-20-97; e-mail: osimonova@hotmail.com

**Подписи к рисункам**

**Рис. 1.** Иммуноблот-анализ белка AHR в полученных нами клеточных культурах остеогенных сарком O.src20/18, O.src17/18, O.src25/16 (**А**) и в клеточныхлиниях неопухолевого (HEK293, MSC) происхождения (**Б**). Белок GAPDH использовался как референсный.

**Рис. 2.** Уровень экспрессии генов *CYP* в клеточных культурах остеосарком без активации AHR лигандами: **А–C**: Уровень экспрессии выровнен относительно клеточной линии O.src17/18. На оси ординат представлено значение R = 2ΔСt, т.е. отношение количества мРНК целевого гена к количеству мРНК генов домашнего хозяйства *GAPDH* и *HPRT1*.