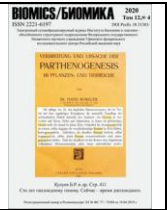




BIOMICS/БИОМИКА



ISSN 2221-6197 <http://biomicsj.ru>

**ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ
АРИЛ-ГИДРОКАРБОНОВОГО РЕЦЕПТОРА ЧЕЛОВЕКА В ТРАНСГЕННОЙ
ЛИНИИ *DROSOPHILA MELANOGASTER***

Акишина А.А.[#], Воронцова Ю.Е.^{##}, Черезов Р.О., Куваева Е.Е., Симонова О.Б., Кузин Б.А.

ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
119334 Россия, г. Москва, улица Вавилова, 26, *e-mail vjul83@mail.ru

Резюме

Арил-гидрокарбонный рецептор (Aryl hydrocarbon receptor, AHR), является важным лиганд-зависимым транскрипционным фактором, сохранившим в процессе эволюции свои структурные и функциональные особенности. Гены-мишени AHR играют ключевую роль в детоксикации, в регуляции процессов развития и поддержания гомеостаза эукариот. Высокий консерватизм AHR человека позволил нам исследовать его функции *in vivo*, используя особей *Drosophila melanogaster*, трансформированных человеческим геном AHR. В отличие от гомолога AHR дрозофилы, не способного активироваться под влиянием экзогенных лигандов, AHR человека можно тканеспецифически активировать в организме трансгенной мухи. Это позволяет анализировать уровень транскрипции генов-мишеней AHR в различных органах и тканях. Результаты наших экспериментов неожиданно показали способность экзогенных лигандов-агонистов не только повышать, но и понижать уровень транскрипции целевых генов AHR. Мы предположили, что отсутствие ожидаемого увеличения транскрипции некоторых генов-мишеней AHR вызвано эпигенетическим сайленсингом. Данная гипотеза была подтверждена в экспериментах с использованием ингибиторов гистоновой лизин-N-метилтрансферазы и на дрозофилах с нулевой мутацией гена *Polycomb*. В результате был открыт новый механизм эпигенетического контроля экспрессии генов-мишеней AHR. Это открытие служит основанием для коррекции существующих концепций о механизме активации целевых генов AHR, большинство из которых является онкогенами.

Ключевые слова: арил-гидрокарбонный рецептор AHR, транскрипция, эпигенетика, *Drosophila melanogaster*

Цитирование: Акишина А.А., Воронцова Ю.Е., Черезов Р.О., Куваева Е.Е., Симонова О.Б., Кузин Б.А. Эпигенетическая модуляция транскрипции генов-мишеней арил-гидрокарбонного рецептора человека в трансгенной линии *Drosophila melanogaster* // Биомика. 2020. Т.12(4). С. 504-509. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-44

© Авторы

**EPIGENETIC MODULATION OF TRANSCRIPTION OF HUMAN ARYL-HYDROCARBOXYLIC
RECEPTOR TARGET GENES IN THE *DROSOPHILA MELANOGASTER* TRANSGENIC LINE**

Akishina A.A.[#], Vorontsova J.E.^{##}, Cherezov R.O., Kuvaeva E.E., Simonova O.B., Kuzin B.A.

Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences
26 Vavilov Street, 119334, Moscow, Russia, * Email: vjul83@mail.ru

Resume

Aryl hydrocarbon receptor (AHR), is an important ligand-dependent transcription factor, which retained its structural and functional features during evolution. AHR target genes play a key role in detoxification, in the regulation of the development and maintenance of eukaryotic homeostasis. The high conservatism of human AHR allowed us to study its functions *in vivo* using transgenic *Drosophila melanogaster* lines with an inducible human AHR gene. It is believed that *Drosophila* AHR homolog isn't activated by exogenous ligands, so human AHR can be tissue-specific activated in the body of a transgenic fly. This allows us to analyze the transcription level of AHR target genes in various organs and tissues. Unexpectedly we found that exogenous AHR ligands can increase as

[#] Равнозначный вклад авторов / These authors contributed equally to this work

well as decrease the transcription levels of the AHR target genes, including genes that control proliferation, motility, polarization, and programmed cell death. We hypothesized that the absence of the expected increase in the transcription of some AHR target genes was caused by its epigenetic silencing. This hypothesis was confirmed in the experiments using histone lysine-N-methyltransferase inhibitors and with *Drosophila* null mutation of the methyltransferase *Pc* gene. As a result a new epigenetic mechanism of modulation of human aryl hydrocarbon receptor target genes transcription was discovered. Since exogenous AHR ligands and small molecule inhibitors of epigenetic modifiers are often used as pharmaceutical anticancer drugs, our findings may have significant implications in designing new combinations of therapeutic treatments for oncological diseases.

Keywords: Aryl hydrocarbon receptor AHR, transcription, epigenetics, *Drosophila melanogaster*

Citation: Akishina A. A., Vorontsova Yu. E., Cherezov R. O., Kuvaeva E. E., Simonova O. B., Kuzin B. A. Epigenetic modulation of transcription of human aryl-hydrocarboxylic receptor target genes in the *Drosophila melanogaster* transgenic line. *Biomics*. V.12(4). P. 504-509. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-44 (In Russian)

© The Authors

Введение

Арил-гидрокарбонный рецептор (Aryl hydrocarbon receptor, AHR), является важным лиганд-зависимым транскрипционным фактором, сохранившим в процессе эволюции свои структурные и функциональные особенности [Duncan et al., 1998; Hahn 2002; Воронцова и др. (Vorontsova et al.), 2018]. В работе мы использовали созданную нами линию дрозофил *UAS-AHR*, трансформированную геном AHR человека, поставленным под контроль индуцибельного дрожжевого промотора *UAS*, позволяющего активировать его при помощи GAL4-тканеспецифических драйверов. В отличие от гомолога AHR дрозофилы, не способного активироваться под влиянием экзогенных лигандов, AHR человека можно тканеспецифически активировать в организме трансгенной мухи. Это позволяет анализировать уровень транскрипции генов-мишеней AHR, содержащих *Xenobiotic Responsible Element* (XRE) в различных органах и тканях, на разных этапах развития дрозофилы (рис. 1). В качестве экзогенных лигандов AHR человека мы использовали индирубин и бета-нафтофлаван - известные агонисты, действие которых приводит к увеличению уровня экспрессии целевых генов AHR человека.

Неожиданно результаты наших экспериментов показали способность экзогенных лигандов-агонистов не только повышать, но и понижать уровень транскрипции генов-мишеней AHR. Мы предположили, что отсутствие ожидаемого увеличения транскрипции некоторых генов-мишеней AHR вызвано эпигенетическим сайленсингом, за который отвечают продукты генов семейства *Polycomb*. Данная гипотеза была подтверждена в генетических экспериментах на фоне нулевой мутации гена *Polycomb* и при использовании ингибитора гистоновой лизин-N-метилтрансферазы.

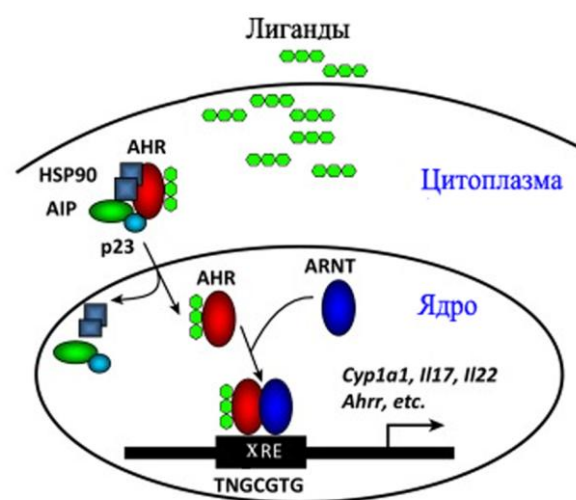


Рис. 1. Схема активации арил-гидрокарбонного рецептора AHR у позвоночных. Белок AHR в неактивном состоянии существует в цитоплазме в мультипептидном комплексе с димером белка теплового шока HSP90, кошапероном p23 и одной молекулой AIP. После связывания с лигандом AHR перемещается в ядро и формирует гетеродимер с ядерным переносчиком арил-гидрокарбонного рецептора (ARNT). Образованный гетеродимер AHR:ARNT взаимодействует с регуляторными элементами XRE (*xenobiotic response element*) генов-мишеней, что приводит к инициации их транскрипции.

Fig 1. The scheme of human aryl-hydrocarbon receptor (AHR) activation. Inactive ligand-free AHR is localized in the cytoplasm as part of a multi-peptide complex containing two molecules of the HSP90, co-chaperone p23, and one molecule of immunophilin-like protein AIP. Following binding to the ligand, AHR translocates to the nucleus, dissociates from HSP90, forms a heterodimer with the ARNT (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) and binds to specific DNA sequences known as the *Xenobiotic Response Elements* (XRE) to induce the transcription of target genes.

Материалы и методы

В работе мы использовали созданную нами линию дрозофил *UAS-AHR*, трансформированную геном *AHR* человека, поставленным под контроль индуцибельного дрожжевого промотора *UAS*, позволяющего активировать его при помощи *GAL4*-тканеспецифических драйверов [Akishina et al., 2017]. Для активации транскрипции гена *AHR* человека в геноме дрозофилы использовали линию-драйвер, обеспечивающую его тканеспецифическую экспрессию в глазных структурах: *GMR-GAL4* (генотип w^* ; $P\{GAL4-ninaE.GMR\}12$). Линия дрозофил, содержащая нулевую мутацию гена *Polycomb*, генотипом $Pc^4p^1e^5/TM6C$, применялась в генетических экспериментах для получения комбинации *GMR-GAL4/UAS-AHR*; $Pc^4/+$. Для этого скрещивали предварительно полученные особи *UAS-AHR*; $Pc^4p^1e^5/TM6C$ с особями *GMR-GAL4/Cy0* и анализировали дрозофил генотипа *GMR-GAL4/UAS-AHR*; $Pc^4p^1e^5/+$. Все скрещивания проводили при температуре 25°C на стандартной среде Formula 4-24 medium (Carolina Biological Supply, USA).

В качестве экзогенных лигандов AHR человека мы использовали индирубин (2'-Z-Indirubin, SML0280, Sigma-Aldrich, USA) и бета-нафтофлаван (A18543, Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, UK), в качестве ингибитора гистоновой лизин-N-метилтрансферазы - UNC1999 (SML0778, Sigma-Aldrich, USA). Лиганды и ингибитор разводили согласно протоколам производителей и добавляли в кормовую среду для дрозофил Formula 4-24 medium в конечные концентрации: индирубин - 25 мкг/г среды, бета-нафтофлаван - 200 мкг/г среды, UNC1999 - 20 мкг/г среды.

Для экспериментов отбирали личиночные особи второй стадии развития и переносили их на кормовую среду с лигандом или ингибитором, далее держали при комнатной температуре (25°C) до взрослой стадии. В качестве контроля использовали дрозофил с тем же генотипом, развивавшихся на стандартной среде. Для ПЦР в реальном времени использовали головы взрослых особей возраста 3 - 5 дней. Примерно 10 - 15 особей на один образец.

Тотальную РНК выделяли с помощью RNeasy (Molecular Research Center, США) согласно протоколу фирмы производителя, обратную транскрипцию проводили с помощью набора реактивов MMLV RT Kit (Евроген, Россия), ПЦР в реальном времени - с помощью набора реактивов qPCRMix-HS-HighRox (Евроген, Россия) и TaqMan® проб (Синтол, Россия). Реакцию ставили в амплификаторе Applied Biosystems 7500 (Applied BioSystems, Life Technologies, USA). Нормализацию результатов проводили по экспрессии гена *Rpl32*. Уровень экспрессии генов оценивали по значению $R = 2\Delta Ct$, т.е. через отношение экспрессии

целевого гена к гену домашнего хозяйства *Rpl32*. Для каждого эксперимента было проведено три биологических повторности. Последовательности праймеров и TaqMan проб можно найти в статье Akishina et al. [2007]. Статистическую обработку результатов проводили с помощью REST program software (Qiagen, USA). Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждения

Для оценки способности лигандов активировать AHR человека в глазных структурах дрозофил анализировали степень фенотипического проявления и уровень транскрипции генов-мишеней.

Для выбора генов-мишеней AHR человека в геноме *Drosophila melanogaster* был выполнен поиск генов, участвующих в процессах регуляции биodeградации токсических факторов (*Cyp6g1*, *GstT4*, *Mgat1*, *ST6Gal*), пролиферации клеток и их дифференцировки (*Myc*, *Rbf*, *Cdc42*, *p53*, *dap*) и в процессах развития (*dl*, *Rel*, *Sox70*, *Jra*). Все гены содержат в своей структуре последовательность *Xenobiotic Response Element (XRE)*. Поиск был основан на анализе литературных данных [Lo et al., 2011; Busbee et al., 2013] и последовательностей промоторных областей генов.

Индукция экспрессии *UAS-AHR* при помощи драйвера *GMR-GAL4* в отсутствие действия экзогенных лигандов не вызывала нарушения развития глазных структур. Индукция экспрессии *UAS-AHR* при помощи драйвера *GMR-GAL4* в сочетании с действием экзогенных лигандов вызывала нарушения развития глазных структур. Фенотипические особенности глазных структур мух дрозофил, *GMR-GAL4*; *UAS-AHR*, развивавшихся на кормовой среде содержащей лиганды и без них, представлены на рис. 2. С помощью ПЦР в реальном времени был проанализирован уровень транскрипционной активности генов-мишеней арил-гидрокарбонowego рецептора человека в геноме дрозофил *GMR-GAL4*; *UAS-AHR*. Выявлено, что уровень транскрипции повышается только у двух генов *St6* и *Relish*. У остальных генов уровень транскрипции не меняется, либо понижается (рис. 2). Фотографии глазных структур мух дрозофил, *GMR-GAL4*; *UAS-AHR*, развивавшихся на кормовой среде без лиганда, демонстрируют упорядоченность построения омматидиев и механорецепторов (микрощетинков) (рис. 2 А, В). Глазные структуры мух *GMR-GAL4*; *UAS-AHR*, развивавшихся на кормовой среде, содержащей бета-нафтофлаван или индирубин (рис. 2 Б, Г) содержат существенные нарушения в построении омматидиев и уменьшенное число механорецепторов.

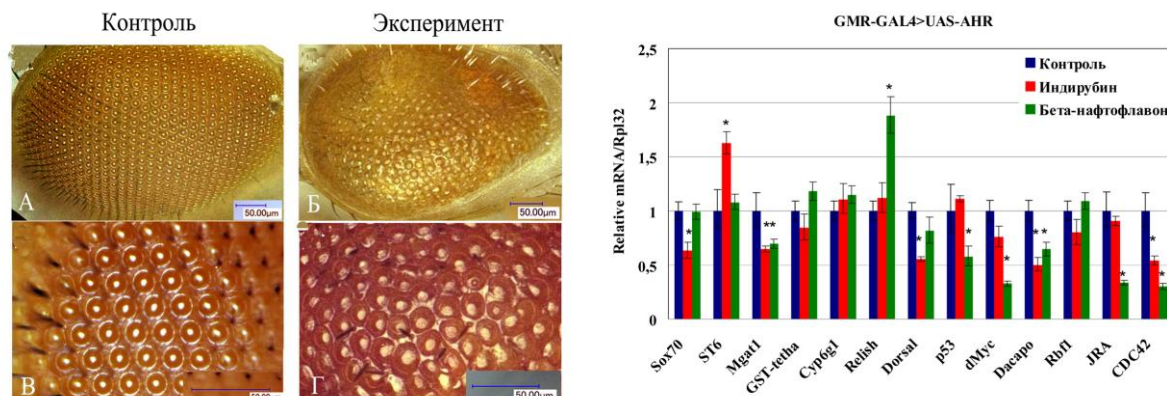


Рис. 2. Слева фотографии глазных структур дрозофил *GMR-GAL4; UAS-AHR*, развивавшихся на кормовой среде без лиганда (А, В) и на кормовой среде, содержащей бета-нафтофлавон или индирубин (Б, Г). Справа уровень экспрессии генов-мишеней АНР человека в головах дрозофил этого же генотипа.

Fig. 2. On the left *Drosophila* eye phenotypes of *GMR-GAL4; UAS-AHR* flies developed on standard medium (A, B), on medium with beta-Naphthoflavone or indirubin (Б, Г). On the right the expression level of AHR target genes in the heads of the same imagoes.

Нужно заметить, что выбранные нами экзогенные лиганды в мировой литературе отнесены к лигандам-агонистам АНР позвоночных. В большинстве случаев такое определение они получили на основе результатов, полученных в экспериментах с культуральными клетками *in vitro*. Их действие обычно приводит к повышению уровня транскрипции целевых генов АНР. Наше исследование с трансгенной линией *Drosophila melanogaster* позволило поставить эксперименты в условиях *in vivo*. Неожиданным результатом оказалось

обнаружение способности лигандов-агонистов как повышать, так и понижать уровень транскрипции целевых генов АНР. Мы предположили, что отсутствие ожидаемого увеличения транскрипции некоторых генов-мишеней АНР вызвано эпигенетическим сайленсингом, за который отвечают продукты генов семейства *Polycomb*. Чтобы проверить эту гипотезу мы проанализировали уровень экспрессии генов-мишеней АНР на фоне нулевой мутации *Pc⁴* и при использовании ингибитора гистоновой лизин-N-метилтрансферазы (UNC1999).

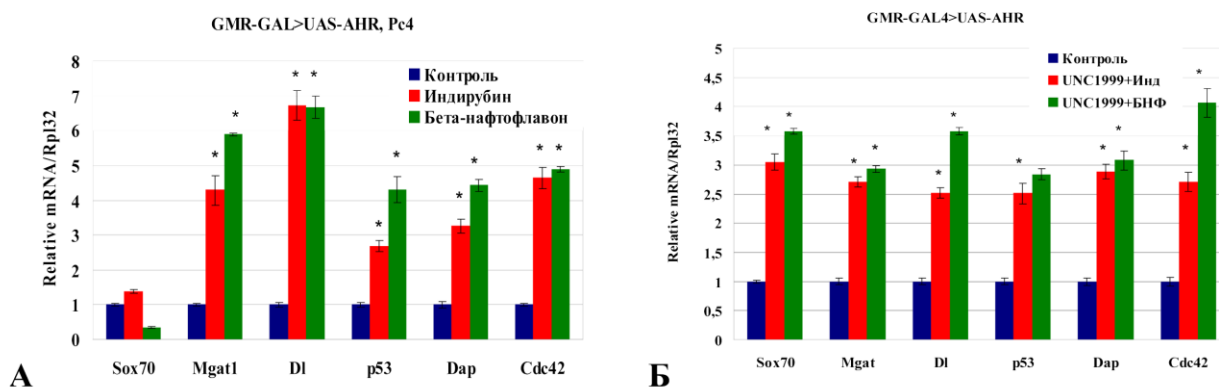


Рис. 3. Уровень экспрессии генов-мишеней АНР человека в головах дрозофил *GMR-GAL4; UAS-AHR* на фоне мутации *Pc⁴* (А) и с добавлением ингибитора гистоновой лизин-N-метилтрансферазы - UNC1999 (Б).

Fig. 3. The expression level of AHR target genes in the heads of *GMR-GAL4; UAS-AHR* imagoes with mutation *Pc⁴* (A) and with inhibitor UNC1999 (Б).

Сравнение графиков уровня транскрипции целевых генов АНР человека в глазных структурах мух *GMR-GAL4; UAS-AHR; Pc⁺* и мух *GMR-GAL4;*

UAS-AHR; Pc⁴ выявило повышение уровней транскрипции целевых генов АНР у особей, мутантных по гену *Polycomb*, развивавшихся на

кормовой среде с лигандами, в сравнении с мухами, имеющими нормальный ген *Pc* (рис. 3).

Сходные результаты были получены в экспериментах, сочетающих действие экзогенных лигандов и ингибитора гистоновой лизин-N-метилтрансферазы - UNC1999. Уровень транскрипции целевых генов АНР в глазных структурах мух *GMR-GAL4; UAS-AHR*, в этих экспериментах повышался в сравнении с мухами, развивавшимися на кормовой среде с экзогенными лигандами, но без UNC1999 (рис. 3Б).

Заключение

В данном исследовании мы показали, что фиксируемое нами разнообразие уровней транскрипции генов-мишеней, в основном, обусловлено структурой хроматина каждого из них. Очевидно, эпигенетические репрессивные метки ограничивают доступность АНР к сайтам связывания в районе подконтрольных ему целевых генов. При их отсутствии доступность регуляторной зоны целевых генов для транскрипционного комплекса АНР:ARNT "открывается" и он начинает активно функционировать (рис. 4).

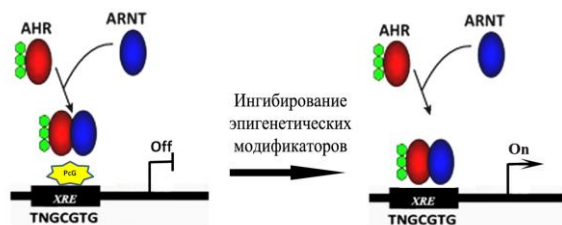


Рис. 4. Схема возможного механизма эпигенетической регуляции транскрипции генов-мишеней АНР.

Fig. 4. The scheme of a possible mechanism for epigenetic regulation of AHR target genes transcription.

В результате был обнаружен механизм контроля индуцибельной экспрессии целевых генов АНР, который заключается в том, что внешний сигнал (лиганд), активирующий АНР, не всегда вызывает эффективный ответ его генов-мишеней. Этот ответ будет эффективным только в случае доступности ДНК регуляторных областей генов-мишеней для АНР, т.е. от статуса хроматина этих областей, который может меняться в разных тканях и на разных стадиях развития организма.

Эти данные служат основанием для коррекции существующих концепций о механизме активации целевых генов АНР, большинство из которых является онкогенами. Поскольку экзогенные лиганды АНР и ингибиторы эпигенетических модификаторов часто используются в качестве фармацевтических противоопухолевых препаратов,

результаты нашей работы необходимо учитывать при разработке новых комбинаций терапевтических схем лечения онкологических заболеваний.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ проекта № 20-04-00272 и с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН.

The work was conducted under RFBR project №20-04-00272 and the IDB RAS Government basic research program in 2020 № 0108-2019-0001. The research was done using equipment of the Core Centrum of Institute of Developmental Biology RAS.

Литература

1. Воронцова Ю.Е., Черезов Р.О., Кузин Б.А., Симонова О.Б. Арил-гидрокарбонный рецептор как потенциальная мишень для противораковой терапии. *Биомедицинская химия* // 2018. Т. 64 (5). С. 397-415. doi: 10.18097/PBMC20186405397
2. Akishina A.A., Vorontsova J.E., Cherezov R.O., Mertsalov I.B., Zatsepina O.G., Slezingher M.S., Panin V.M., Petruk S., Enikolopov G.N., Mazo A., Simonova O.B., Kuzin B.A. Xenobiotic-induced activation of human aryl hydrocarbon receptor target genes in *Drosophila* is mediated by the epigenetic chromatin modifiers // *Oncotarget*. 2017. V. 8(61). P. 102934–102947. doi: 10.18632/oncotarget.22173
3. Busbee P.B., Rouse M., Nagarkatti M., Nagarkatti P.S. Use of natural AhR ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders // *Nutr. Rev.* 2013. V. 71(6). P. 353–369. doi: 10.1111/nure.12024
4. Duncan D.M., Burgess E.A., Duncan I. Control of distal antennal identity and tarsal development in *Drosophila* by spineless-aristapedia, a homolog of the mammalian dioxin receptor // *Genes Dev.* 1998. V. 12(9). P. 1290–1303. doi: 10.1101/gad.12.9.1290
5. Hahn M.E. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution // *Chem. Biol. Interact.* 2002. V. 141(1-2). P. 131–160. doi: 10.1016/S0009-2797(02)00070-4
6. Lo R., Celius T., Forgacs A.L., Dere E., MacPherson L., Harper P., Zacharewski T., Matthews J. Identification of aryl hydrocarbon receptor binding targets in mouse hepatic tissue treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2011. V. 257 (1). P. 38–47. doi: 10.1016/j.taap.2011.08.016

References

1. Vorontsova J.E., Cherezov R.O., Kuzin B.A., Simonova O.B. Aryl-Hydrocarbon receptor as a potential target for anticancer therapy. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B Biomedical Chemistry*. 2019. V. 13(1). P. 36-54. doi: 10.1134/S1990750819010116
2. Akishina A.A., Vorontsova J.E., Cherezov R.O., Mertsalov I.B., Zatsepina O.G., Slezingher M.S., Panin V.M., Petruk S., Enikolopov G.N., Mazo A., Simonova

- O.B., Kuzin B.A. Xenobiotic-induced activation of human aryl hydrocarbon receptor target genes in *Drosophila* is mediated by the epigenetic chromatin modifiers. *Oncotarget*. 2017. V. 8(61). P. 102934–102947. doi: 10.18632/oncotarget.22173
3. Busbee P.B., Rouse M., Nagarkatti M., Nagarkatti P.S. Use of natural AhR ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders. *Nutr. Rev.* 2013. V. 71(6). P. 353–369. doi: 10.1111/nure.12024
4. Duncan D.M., Burgess E.A., Duncan I. Control of distal antennal identity and tarsal development in *Drosophila* by spineless-aristopedia, a homolog of the mammalian dioxin receptor. *Genes Dev.* 1998. V. 12(9). P. 1290–1303. doi: 10.1101/gad.12.9.1290
5. Hahn M.E. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem. Biol. Interact.* 2002. V. 141(1-2). P. 131–160. doi: 10.1016/s0009-2797(02)00070-4
6. Lo R., Celiuș T., Forgacs A.L., Dere E., MacPherson L., Harper P., Zacharewski T., Matthews J. Identification of aryl hydrocarbon receptor binding targets in mouse hepatic tissue treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2011. V. 257 (1). P. 38–47. doi: 10.1016/j.taap.2011.08.016