

А.А. Головнина , Д.А. Четверина* , М.М. Ерохин 

Институт Биологии гена Российской Академии наук, Россия, г. Москва

*e-mail: daria.chetverina@gmail.com

АМПЛИФИКАЦИЯ И ПОВЫШЕННАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ZNF281 ПРИ РАКЕ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КОРРЕЛИРУЮТ С НЕГАТИВНЫМ ПРОГНОЗОМ

Установление точных паттернов экспрессии генов в разных типах клеток необходимо для правильной дифференцировки и развития многоклеточных организмов. Результирующий уровень транскрипции определяется как генетически нуклеотидной последовательностью ДНК, так и эпигенетическими факторами, модифицирующими хроматин. Группа Polycomb (PcG) представляет собой эволюционно консервативную группу эпигенетических белков, которые контролируют неактивное состояние генов. Нарушение активности белков группы Polycomb приводит к аномалиям развития и к онкологическим заболеваниям. Белки PcG образуют два основных комплекса: Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) и Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), которые обладают убиквитинлигазной и гистонметилтрансферазной ферментативной активностью, соответственно. Было предложено несколько механизмов для объяснения принципов рекрутирования белков Polycomb у млекопитающих, один из которых включает взаимодействие со специфическими ДНК-связывающими факторами. В то время как нарушение регуляции основных генов PcG при раке хорошо задокументировано, роль ДНК-связывающих партнеров PcG в онкологии остается неясной.

В настоящем исследовании проанализированы общедоступные порталы геномных и транскриптомных баз данных клинических образцов опухолей (cBioPortal, TNMplot, KMplot) для оценки корреляций ДНК-связывающих белков, ассоциированных с Polycomb. Обнаружено, что амплификация и повышенная экспрессия гена ZNF281 часто присутствуют при раке поджелудочной железы и коррелируют с негативным прогнозом общей выживаемости.

Ключевые слова: Polycomb, ZNF281, онкология, рак поджелудочной железы.

Alexandra Golovkina, Darya Chetverina*, Maksim Erokhin

Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Russia, Moscow

*e-mail: daria.chetverina@gmail.com

Amplification and higher expression of the ZNF281 gene in pancreatic cancer correlates with poor prognosis

Establishing precise gene expression patterns in different cell types is essential for the proper differentiation and development of multicellular organisms. The resulting level of transcription is determined both by the genetic nucleotide sequence of DNA and by epigenetic factors that modify chromatin. Epigenetic repressors of the Polycomb group (PcG) are regulatory proteins that repress gene transcription and maintain correct pattern of gene expression in multicellular organisms. PcG proteins form two main complexes: Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) and Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) that possess ubiquitin ligase and histone methyltransferase enzymatic activities, respectively. Several mechanisms have been suggested to account for the recruitment of Polycomb proteins in mammals, one of which involves interactions with specific DNA-binding factors. While deregulation main PcG genes in cancer have been well documented, the role of PcG DNA-binding partners in oncology remains elusive.

In the present study, we analyzed genomic and transcriptomic databases of clinical tumor samples (cBioPortal, TNMplot, KMplot) to evaluate clinical correlations of Polycomb-associated DNA-binding proteins. We found that amplifications and higher expression of the ZNF281 gene are often found in pancreatic cancer and correlate with poor prognosis of overall survival.

Key words: Polycomb, ZNF281, oncology, pancreatic cancer.

А.А. Головнина, Д.А. Четверина*, М.М. Ерохин

Ресей Ғылым академиясының гендік биология институты, Ресей, Мәскеу қ.

*e-mail: daria.chetverina@gmail.com

Ұйқы безі қатерлі ісігіндегі ZNF281 генінің амплификациясы және экспрессиясының жоғарылауы теріс болжаммен байланысты

Көпклеткалы организмдердің дамуы мен дұрыс дифференциялануы үшін түрлі клеткалардағы ген экспрессиясының нақты паттернін анықтау қажет. Транскрипцияның нәтижелі деңгейі ДНҚ нуклеотидтерінің генетикалық тізбегімен, эпигенетикалық факторлармен және модификациялаушы хроматинмен анықталады. Polycomb (PcG) тобының эпигенетикалық репрессорлары – ген транскрипциясын репрессиялайтын және көпжасушалы организмдердегі ген экспрессиясының дұрыс үлгісін сақтайтын реттеуші белоктар. PcG белоктары екі негізгі кешенді құрайды: убиквитинлигазалы және гистонметилтрансферазалы ферментативті белсенділігі бар Polycomb Repressive Complex 1 (PRC 1) және Polycomb Repressive Complex 2 (PRC 2). Сүтқоректілерде Polycomb белоктарын тартуды (рекруттауды) түсіндіру үшін бірнеше механизмдер ұсынылды, олардың бірі ДНҚ-ны байланыстыратын арнайы факторлармен өзара әрекеттесуді қамтиды. Қатерлі ісіктегі негізгі PcG гендерінің реттелуінің бұзылуы жақсы құжатталғанымен, онкологиядағы PcG ДНҚ байланыстырушы серіктестерінің рөлі түсініксіз болып қалады.

Осы зерттеуде біз Polycomb-пен байланысты ДНҚ-байланыстыратын белоктардың клиникалық корреляциясын бағалау үшін клиникалық ісік үлгілерінің (cBioPortal, TNMplot, KMplot) геномдық және транскриптомдық дерекқорларын талдадық. Біз ZNF281 генінің амплификациясы мен экспрессиясының жоғарылауы ұйқы безінің қатерлі ісігінде жиі кездесетінін және жалпы өмір сүрудің теріс болжамымен байланысты екенін анықтадық.

Түйін сөздер: Polycomb, ZNF281, онкология, ұйқы безінің қатерлі ісігі.

Введение

Репрессоры группы Polycomb являются консервативными в эволюции эпигенетическими регуляторами, ответственными за подавление транскрипции определенных генов [1-3]. Впервые они были открыты в организме плодовой мушки *Drosophila melanogaster* как регуляторы HOX-факторов, определяющих сегментацию и развитие эмбриона на ранних стадиях развития. В дальнейшем было показано, что данная группа белков регулирует транскрипцию и множества других генов, вовлечённых в разные биологические процессы. На сегодня известно, что нарушения в работе Polycomb-факторов связаны со многими патологиями человека и, прежде всего, с онкологическими заболеваниями [4-6].

Биохимическими методами были описаны два основных комплекса Polycomb-белков – Polycomb repressive complex 1 и 2 (PRC1 и PRC2, соответственно). Каталитическая субъединица PRC1, белок RING1A/B, отвечает за убиквитинирование лизина в позиции H2AK119. В составе комплекса PRC2 содержится метил-трансфераза EZH2, ответственная за модификации H3K27me1/2/3 [7]. Так как повышенная активность компонентов комплексов PRC1 и PRC2 связана с плохими прогнозами продолжительности жизни во многих видах рака, в настоящее

время разрабатываются и проходят клинические испытания различные низкомолекулярные ингибиторы данных факторов. Первый ингибитор активности EZH2, таземетостат, был одобрен для клинического использования Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) в 2020 году при терапии эпителиоидных сарком и фолликулярных лимфом [8,9].

На сегодняшний день активно исследуется вопрос о специфическом привлечении (рекрутировании) комплексов PRC1 и PRC2 в строго определенные области хроматина. Лучше всего данные процессы изучены на примере генома дрозофилы, где репрессоры группы Polycomb рекрутируются на специализированные ДНК-элементы, названные PRE (Polycomb Response Elements, [10,11]). Элементы PRE являются относительно короткими участками ДНК (200-500 п.н.), которые содержат мотивы для ДНК-связывающих белков, способных образовывать контакты с компонентами PRC1 и PRC2. У человека данный вопрос исследован в меньшей степени, однако в настоящее время известен ряд ДНК-связывающих факторов, ассоциированных с Polycomb-белками. Предполагается, что данные белки также могут играть большую роль в рекрутировании PRC1 и PRC2 комплексов на хроматин [12].

В настоящем исследовании мы провели анализ известных белковых партнеров Polycomb-ассоциированных ДНК-связывающих факторов генома человека, используя базы данных KMplot, TNMplot и cBioPortal. В результате был выявлен ген, кодирующий белок ZNF281, нарушение экспрессии которого наблюдается в случае рака поджелудочной железы и служит признаком негативного прогноза для общей продолжительности жизни пациентов.

Материалы и методы

Поиск белковых партнеров факторов PRC1 и PRC2 был проведен с помощью базы данных BioGRID (<https://thebiogrid.org/>) [13].

Изменения в уровнях транскрипции изучаемых генов в нормальных и трансформированных тканях были проанализированы с использованием базы данных TNMplot [14]. Для анализа использовались данные экспрессии, полученные с помощью метода генных чипов (Gene-chip data) и RNAseq.

Прогнозы общей выживаемости (OS) были исследованы с помощью базы данных KMplot (Kaplan-Meier Plotter, [15]).

Генетические мутации изучаемых генов были исследованы с использованием базы данных cBioPortal [16].

Результаты и обсуждение

На первом этапе мы определили набор транскрипционных факторов, для которых ранее была показана ассоциация с различными компонентами комплексов PRC1 и PRC2 с использованием базы данных BioGRID. На следующем этапе для каждого ДНК-связывающего фактора был проведен анализ изменений в структуре и уровне экспрессии в следующих базах данных:

1. cBioPortal – исследованы генетические мутации в изучаемом гене.

2. TNMplot – исследован уровень транскрипции в нормальных и опухолевых тканях.

3. KMplot – исследованы изменения в общей продолжительности жизни пациентов в группах с высоким и низким уровнем транскрипции изучаемого гена.

В результате были установлены статистически значимые изменения в структуре и экспрессии гена ZNF281 в случае рака поджелудочной железы при анализе всех трех баз данных.

Белок ZNF281, длиной около 900 а.о., содержит в своем составе ДНК-связывающий домен, состоящий из 4 tandemно расположенных мотивов «цинковые пальцы» C2H2-типа (Рис. 1А). Домены подобного типа обеспечивают узнавание протяженных мотивов в составе ДНК и специфичное связывание с данными участками [17].

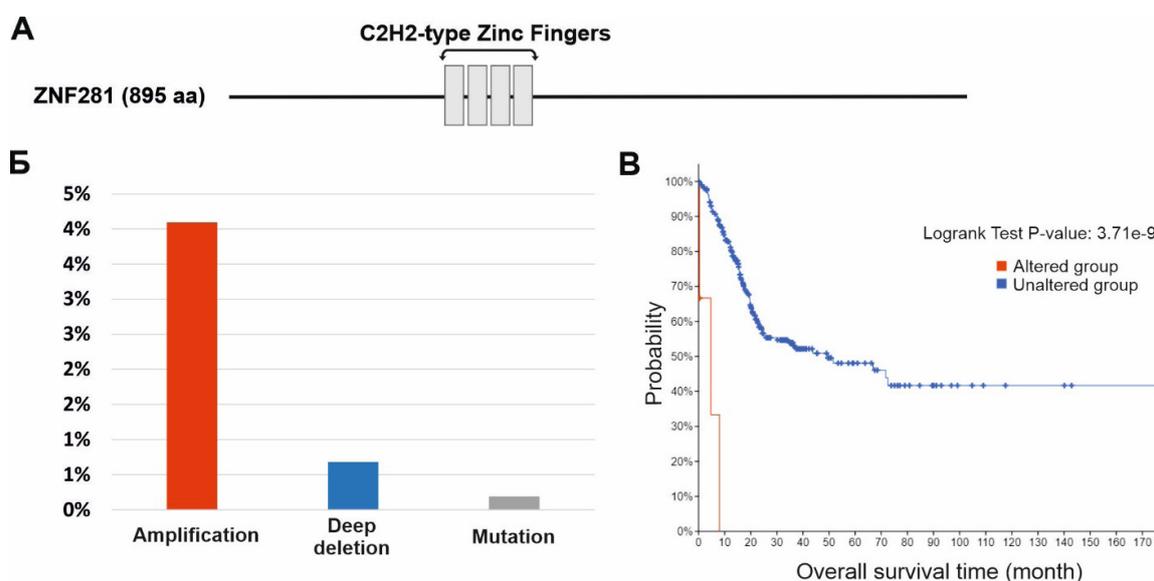


Рисунок 1 – Амплификация гена ZNF281 в образцах рака поджелудочной железы.

А. Схематическое изображение структуры белка ZNF281 (UniProt ID Q9Y2X9, 895 а.о.).

Вертикальными прямоугольниками показаны домены «цинковые пальцы» C2H2-типа.

Б. Частота встречаемости нарушений гена ZNF281 в образцах рака поджелудочной железы.

В. Прогноз общей продолжительности жизни пациентов с амплификацией гена ZNF281 (красный график) и контрольной группы (синий график)

При анализе базы данных cBioPortal было обнаружено, что большая часть нарушений гена ZNF281 в образцах рака поджелудочной железы представлена амплификациями (Рис. 1Б). Данный тип генетических нарушений встречался в более 4% случаев, тогда как частота делеций и точечных мутаций не превышала 1%. Анализ общей продолжительности жизни пациентов с раком поджелудочной железы показал, что амплификация гена ZNF281

статистически значимо ($p\text{-value}=3,71\text{E-}09$) коррелирует с негативным прогнозом (Рис. 1В).

Сравнение транскрипции гена ZNF281 в нормальных и трансформированных тканях поджелудочной железы с помощью базы данных TNMplot показало, что средний уровень транскрипции был в среднем выше в 2,26 раза в случаях с онкопатологией ($p\text{-value} = 6.14\text{E-}36$, Рис.2А).

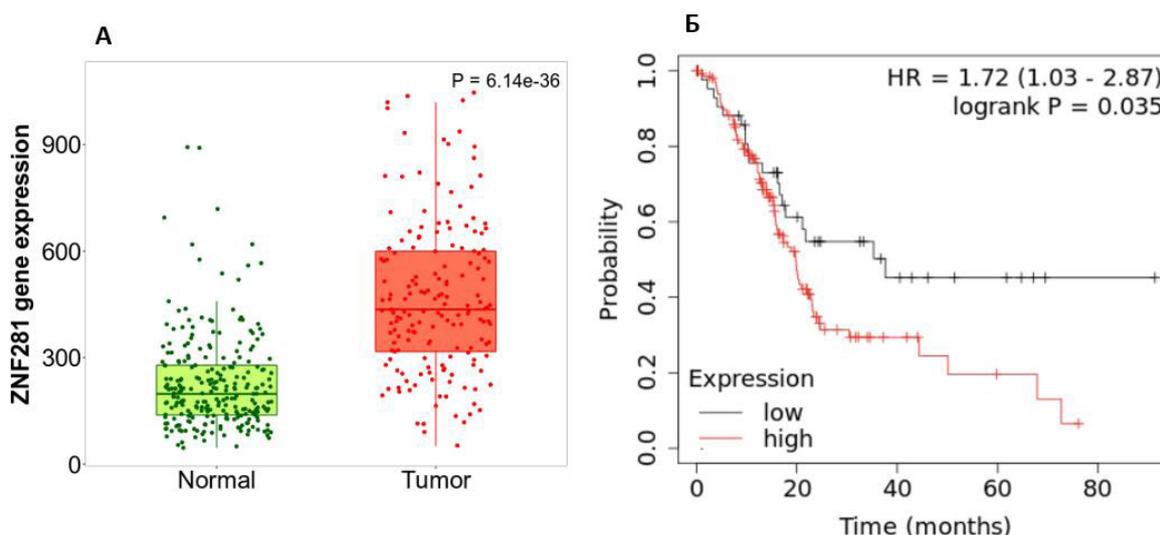


Рисунок 2 – ZNF281 гиперэкспрессируется при онкопатологиях поджелудочной железы, что коррелирует с негативным прогнозом выживаемости пациентов.

А. Данные по экспрессии гена ZNF281 (база TNMplot) в образцах, полученных от пациентов с раком поджелудочной железы (красный график, Tumor) и в контрольной группе (зеленый график, Normal).

Число исследованных образцов тканей поджелудочной железы в норме 108, при онкопатологии – 248.

Б. Данные об общей продолжительности жизни пациентов, представленные в виде графика Каплана–Мейера (база KMplot). Пациенты ($n=177$) были разделены на подгруппы с высоким ($n=133$, красный график) и низким ($n=44$, черный график) уровнем транскрипции гена ZNF281.

По оси абсцисс указана продолжительность жизни в месяцах

Далее были проанализированы данные базы KMplot, сравнивающие продолжительность жизни больных с высоким и низким уровнем транскрипции гена ZNF281 в случае рака поджелудочной железы (Рис. 2Б). В результате было установлено, что у группы с повышенным уровнем транскрипции данного гена общая продолжительность жизни ниже ($p\text{-value} = 0.035$; $HR = 1.72$), чем у пациентов с пониженной транскрипцией ZNF281.

Заключение

Разработка подходов к лечению онкологических заболеваний путем контроля активности

белков группы Polysomb – важная задача современной молекулярной биологии. Так как нарушения системы Polysomb часто встречаются в различных типах рака, ранее был разработан ряд низкомолекулярных ингибиторов, блокирующих их функции [18,19]. Подавляющее большинство таких ингибиторов направлено на блокирование ферментативных активностей комплексов PRC1 и PRC2. Однако тотальное подавление активности Polysomb-репрессоров, может приводить к общей дестабилизации генома [20-21], и, как следствие, к многочисленным побочным эффектам. Одним из потенциальных подходов к более специфическому и локальному контролю активности белков Polysomb является воздей-

ствии на ДНК-связывающие факторы, которые рекрутируют данные репрессоры на хроматин. Разработка дополнительных агентов, блокирующих привлечение Polycomb-репрессоров только в ряде определенных мест генома, может привести к созданию оптимальных протоколов терапии онкозаболеваний.

В настоящем исследовании, используя альтернативные базы данных, мы провели анализ изменений в структуре и уровне транскрипции ряда известных ДНК-связывающих факторов, ассоциированных с белками группы Polycomb, в различных типах рака. Было установлено, что повышенная активность гена ZNF281, кодирующего белок с ДНК-связывающими доменами типа «цинковые пальцы» C2H2-типа, связана с негативными прогнозами общей продолжительности жизни у пациентов с раком поджелудочной железы. Данный тип рака на сегодняшний день является одним из самых сложных для лечения, и усилия многих научных лабораторий и фармацевтических групп направлены на поиск лекарственных препаратов, способных блокировать пролиферацию клеток онкопатологии данного типа [22-24].

Доказательства биологической значимости ZNF281 для клеток рака поджелудочной железы поддерживаются несколькими установленными фактами. Во-первых, наиболее частый тип изменений ZNF281 на уровне ДНК – амплификация.

Более того, увеличение числа копий изучаемого гена связано с плохим прогнозом общей продолжительности жизни пациентов. Во-вторых, уровень транскрипции ZNF281 выше в трансформированных клетках поджелудочной железы по сравнению с нормальными тканями. В-третьих, повышенная транскрипция гена ZNF281 связана с меньшей продолжительностью жизни пациентов при онкозаболеваниях данного типа. Таким образом, все три использованные базы данных показывают, что ZNF281 может служить перспективной мишенью для терапии рака поджелудочной железы.

Блокирование активности фактора ZNF281 может быть осуществлено разными способами, включая CRISPR-зависимые подходы подавления экспрессии генов, методы РНК-интерференции, либо блокирование ДНК-связывающего домена ZNF281 короткими олигонуклеотидами, имитирующими сайт связывания данного белка. Комбинированное использование ингибиторов Polycomb-репрессоров и блокирование фактора ZNF281 может привести к оптимизации протоколов лечения пациентов с раком поджелудочной железы.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант №20-74-10099. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Kuroda MI, Kang H, De S, Kassis JA. Dynamic Competition of Polycomb and Trithorax in Transcriptional Programming. *Annu Rev Biochem.* 2020. 89:235-253. doi: 10.1146/annurev-biochem-120219-103641.
2. Schuettengruber B, Bourbon HM, Di Croce L, Cavalli G. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell.* 2017. 171(1):34-57. doi: 10.1016/j.cell.2017.08.002.
3. Di Croce L, Helin K. Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nat Struct Mol Biol.* 2013. 20(10):1147-55. doi: 10.1038/nsmb.2669.
4. Chetverina D.A., Lomaev D.V., Georgiev P.G., Erokhin M.M. *Genetic Impairments of PRC2 Activity in Oncology: Problems and Prospects.* Russian Journal of Genetics. 2021. 57(3), 258-272.
5. Parreno V, Martinez AM, Cavalli G. Mechanisms of Polycomb group protein function in cancer. *Cell Res.* 2022. 32(3):231-253. doi: 10.1038/s41422-021-00606-6.
6. Erokhin M, Chetverina O, Györfy B, Tatarskiy VV, Mogila V, Shtil AA, Roninson IB, Moreaux J, Georgiev P, Cavalli G, Chetverina D. Clinical Correlations of Polycomb Repressive Complex 2 in Different Tumor Types. *Cancers (Basel).* 2021. 13(13):3155. doi: 10.3390/cancers13133155.
7. Chetverina DA, Lomaev DV, Erokhin MM. Polycomb and Trithorax Group Proteins: The Long Road from Mutations in Drosophila to Use in Medicine. *Acta Naturae.* 2020. 12(4):66-85. doi: 10.32607/actanaturae.11090.
8. Straining R, Eighmy W. Tazemetostat: EZH2 Inhibitor. *J Adv Pract Oncol.* 2022 13(2):158-163. doi: 10.6004/jadpro.2022.13.2.7.
9. Hoy SM. Tazemetostat: First Approval. *Drugs.* 2020 80(5):513-521. doi: 10.1007/s40265-020-01288-x.
10. Kassis JA, Brown JL. Polycomb group response elements in Drosophila and vertebrates. *Adv Genet.* 2013. 81:83-118. doi: 10.1016/B978-0-12-407677-8.00003-8.
11. Chetverina DA, Elizar'ev PV, Lomaev DV, Georgiev PG, Erokhin MM. [Control of the gene activity by polycomb and trithorax group proteins in Drosophila]. *Genetika.* 2017. 53(2):133-54. Russian.

12. Erokhin M, Georgiev P, Chetverina D. Drosophila DNA-Binding Proteins in Polycomb Repression. *Epigenomes*. 2018. 2(1):1. doi: 10.3390/epigenomes2010001.
13. Oughtred R, Rust J, Chang C, Breitkreutz BJ, Stark C, Willems A, Boucher L, Leung G, Kolas N, Zhang F, et al. The BioGRID database: A comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions. *Protein Sci*. 2021. 30(1):187-200. doi: 10.1002/pro.3978.
14. Bartha Á, Györfly B. TNMplot.com: A Web Tool for the Comparison of Gene Expression in Normal, Tumor and Metastatic Tissues. *Int J Mol Sci*. 2021. 22(5):2622. doi: 10.3390/ijms22052622.
15. Nagy Á, Munkácsy G, Györfly B. Pancancer survival analysis of cancer hallmark genes. *Sci Rep*. 2021. 11(1):6047. doi: 10.1038/s41598-021-84787-5.
16. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*. 2012. 2(5):401-4. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095.
17. Fedotova AA, Bonchuk AN, Mogila VA, Georgiev PG. C2H2 Zinc Finger Proteins: The Largest but Poorly Explored Family of Higher Eukaryotic Transcription Factors. *Acta Naturae*. 2017. 9(2):47-58.
18. Itoh Y, Takada Y, Yamashita Y, Suzuki T. Recent progress on small molecules targeting epigenetic complexes. *Curr Opin Chem Biol*. 2022. 67:102130. doi: 10.1016/j.cbpa.2022.102130.
19. Eich ML, Athar M, Ferguson JE 3rd, Varambally S. EZH2-Targeted Therapies in Cancer: Hype or a Reality. *Cancer Res*. 2020. 80(24):5449-5458. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-2147.
20. Wassef M, Rodilla V, Teissandier A, Zeitouni B, Gruel N, Sadacca B, Irondelle M, Charruel M, Ducos B, Michaud A, et al. Impaired PRC2 activity promotes transcriptional instability and favors breast tumorigenesis. *Genes Dev*. 2015. 29(24):2547-62. doi: 10.1101/gad.269522.115.
21. Veneti Z, Gkouskou KK, Eliopoulos AG. Polycomb Repressor Complex 2 in Genomic Instability and Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017. 18(8):1657. doi: 10.3390/ijms18081657.
22. Kim J. Cell Dissemination in Pancreatic Cancer. *Cells*. 2022. 11(22):3683. doi: 10.3390/cells11223683.
23. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2016. 22(44):9694-9705. doi: 10.3748/wjg.v22.i44.9694.
24. Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K. Pancreatic cancer. *Lancet*. 2016. 388(10039):73-85. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00141-0.