

АНОПРІЄНКО О. В.<sup>1✉</sup>, АРЕШКОВ П. О.<sup>1</sup>, ЖУК О. В.<sup>1</sup>, ШАБЛІЙ В. А.<sup>1,2</sup>, СКРИПКІНА І. Я.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Ак. Заболотного, 150, e-mail: o.v.anoprienko@imbg.org.ua

<sup>2</sup> Інститут клітинної терапії,

Україна, 03680, м. Київ, просп. Комарова, 3

✉ o.v.anoprienko@imbg.org.ua

### КОМПЛЕКСНА РЕГУЛЯЦІЯ ГЕПАРИНОМ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА *CHI3L1* ТА ЛОКУСУ *ERVW-1* У КЛІТИНАХ ГЛІОБЛАСТОМ U-87 MG ТА U-251 MG

**Мета.** Дослідити вплив гепарину як фактора мікрооточення пухлин на експресію локусу *ERVW-1* та гена *CHI3L1*, продукти яких залучені у підвищення метастатичного потенціалу ракових клітин, у клітинах гліобластом U-87 MG (U87) та U-251 MG (U251). **Методи.** Клітини U87 та U251 культивували без додавання (контрольні) або з додаванням гепарину у культуральне середовище. Тотальну РНК з клітин використовували для синтезу кДНК і наступної ПЛР з праймерами, що охоплювали різні ділянки локусу *ERVW-1* та гена *CHI3L1*. **Результати.** У контрольних клітинах обох ліній значний рівень експресії виявлено для повної форми транскрипту локусу *ERVW-1*, яка блокувалася за впливу гепарину тільки у клітинах U251. Експресія сплайсованої форми не детектувалася в усіх досліджених варіантах. Транскрипт лише гена *env* виявляли і в U87, і в U251, а його повне інгібування спостерігали в обох лініях за додавання гепарину. Експресія *CHI3L1* детектувалася в обох лініях із праймерами до екзонів 3–5 із деяким зниженням за дії гепарину. Проте ПЛР-продукт до екзонів 8–9 виявлявся тільки у клітинах лінії U87. У клітинах U87, не оброблених гепарином, виявлено гіпотетичну сплайсовану форму транскрипту *CHI3L1*. **Висновки.** Гепарин комплексно та лінійспецифічно впливає на експресію локусу *ERVW-1* і гена *CHI3L1* у клітинних лініях гліобластом U87 та U251.

**Ключові слова:** гліобластома, гепарин, *ERVW-1*, *CHI3L1*.

Гліобластома, що є найбільш поширеною та агресивною формою раку мозку, за даними сучасних геномних та протеомних досліджень, є надзвичайно гетерогенною хворобою. Крім комплексного гетерогенного мікрооточення пухлини, яке охоплює нейрони, імунні і мезенхімальні клітини та фактори, які вони продуку-

ють, кровоносні судини та зони динамічних змін рН і рівня кисню, значну пластичність виявляють самі гліомні клітини, які перебувають у динамічному стані диференціації/диференціації [1], що у сумі призводить до значних відмінностей у строках виживаності пацієнтів [1]. Існує велика панель ліній клітин гліобластом, які значно відрізняються за генетичними і епігенетичними характеристиками [2]. Загалом особливості клітинних ліній можуть відображати відмінності у їхніх певних проміжних, але рівноважних станах у процесах диференціації/диференціації або епітеліально-мезенхімального переходу, які характерні для ракових клітин. Встановлення молекулярних рис цих станів і факторів, що їх модулюють, є надзвичайно важливим для ефективної таргетної терапії пухлин.

Останнім часом у якості перспективного агента проти гліомної терапії розглядається глікозаміноглікан гепарин [3]. В організмі він продукується лише тучними клітинами, яким приділяється все більше уваги у зв'язку з їх роллю у гліомагенезі [4]. Хоча у клініці гепарин застосовується в основному як антикоагулянт, його зв'язування може моделювати численні сигнальні шляхи [4]. Відомі більш ніж 100 гепарин-зв'язуючих протеїнів, серед яких важливими є цитокіни, хемокіни і ростові фактори. Було виявлено, що гепарин разом з основним фактором росту фібробластів (bFGF) є фактором диференціації нейральних стовбурових клітин у нейрони [5]. Гепарин – препарат плейотропної дії, відомий широким спектром протизапальної та імунomodуючої активності, незалежної від його антикоагулянтної дії [6]. Проте гепарин також блокує включення екстрацелюлярних везикул, що може значно знижувати ефективність хіміотерапії [3].

© АНОПРІЄНКО О. В., АРЕШКОВ П. О., ЖУК О. В., ШАБЛІЙ В. А., СКРИПКІНА І. Я.

Одним із факторів, що зв'язує гепарин, є лектин хітіназа-3-подібний протеїн 1 (*CHI3L1*), який має властивості цитокінів і ростових факторів [7]. *CHI3L1* експресується і секретується багатьма типами солідних пухлин, включаючи гліобластому, рак товстої кишки, рак молочної залози і злоякісну меланому. Встановлено, що *CHI3L1* відіграє ключову роль у загостренні запальних процесів і сприянні ангиогенезу та ремоделюванні позаклітинного матриксу [8].

Синцитин-1 – фузогенний глікопротеїн людини, що кодується *env*-геном локусу ендогенного ретровірусу *ERVW-1*, дезрегуляція експресії якого спостерігається у багатьох типах раку [9, 10].

Експресія протеїнів, що кодуються генами *CHI3L1* та *ERVW-1*, підвищує метастатичний потенціал ракових клітин і може бути маркером їх злоякісного перетворення [10, 11]. Ці гени можуть певним чином відповідати на дію гепарину і відображати різні аспекти його активності. Таким чином, актуальним є вивчення регуляції експресії генів *CHI3L1* та *ERVW-1* гепарином для комплексного розуміння механізмів його протипухлинної дії. У роботі ми досліджували вплив гепарину на експресію локусу *ERVW-1* та гена *CHI3L1* у клітинах гліобластом додаванням його у культуральне середовище до клітин ліній гліобластом U87 та U251.

### Матеріали і методи

Лінія гліобластоми людини U-251 MG (надалі U251) була люб'язно надана доктором М. Сансоном (M. Sanson, INSERM, U711, Biologie des Interactions Neurones & Glie, Париж, Франція); лінія U-87 MG (надалі U87) була придбана у Sigma-Aldrich (USA). Клітини U87 та U251 культивували в CO<sub>2</sub>-інкубіторі за 37°C та 5 % CO<sub>2</sub> у середовищі DMEM з 10 % FBS з додаванням або без додавання 125 мкг/мл гепарину (Новофарм Біосинтез, Україна). Контрольні і дослідні клітини (з гепарином) проходили одне пасування, після якого їх ростили до 80–90 % конфлюентності на культуральній чашці діаметром 100 мм і використовували для виділення тотальної РНК.

РНК виділяли за допомогою innuSOLV RNA Reagent (Analytic Jeena AG), концентрацію вимірювали на спектрофотометрі Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) та 1 мкг тотальної РНК використовували для синтезу кДНК (cDNA synthesis kit, Thermo Fisher Scientific) з попередньою обробкою ДНКазою I (Thermo Fisher

Scientific) згідно з рекомендаціями виробника. 2 мкл з 20 мкл кДНК суміші використовували для ПЛР з праймерами до різних ділянок гена *CHI3L1* та геномного локусу *ERVW-1*.

Для гена *CHI3L1* використовували такі набори праймерів: до 3–5 екзонів гена (*CHI3L1-ex3F* acacactcaagaacaggaa та *CHI3L1ex5R* tgattagggtgtaaaatgc); до 8–9 екзонів (*CHI3L1ex8F* ggaccctgcctactatgatgc та *CHI3L1ex9R* gtactgca-ccttctttgacg); третя пара охоплювала всю кодуючу частину з 1 до 9 екзону (*CHI3L1ex1F* ctgctagctgcagccagaatgggtgtgaaggc та *CHI3L1ex9R*). Для геномного локусу *ERVW-1* використовували пари праймерів на повнорозмірну (5'-ділянку повної форми транскрипта, що охоплює гени *gag*, *pol* та *env*) та сплайсовану (забезпечує експресію *env* з 5'-LTR локусу) форми РНК транскрипта *ERVW-1*, люб'язно надані доктором J. Herik [12]. Третя пара була підібрана тільки до *env*-гена локусу (*Sync1F*: tcatatctaagcccgcaac *Sync1R*: tgatcttgaaggtagcag) (рис. 2). У якості контрольного гена використовували ген домашнього господарства *ACTB* (*ACTB-384-F* gctatccctgtacgcctctg та *ACTB-384-R* aggaaggaaggctggaagag).

### Результати та обговорення

У попередніх дослідженнях було встановлено, що продукція гена *CHI3L1* відбувається тільки у клітинах U87, але не у U251 (Арешков П. та співавтори, неопубліковані дані), що корелює з більш злоякісними властивостями лінії U87. Проте на рівні РНК експресія *CHI3L1* детектується і в клітинах U87, і в клітинах U251. Серед факторів, які зумовлюють таку регуляцію, можуть бути малі інтерферуючі РНК і альтернативний сплайсинг, який спричиняє продукцію ізоформи протеїну, що не впізнається комерційними антитілами. Синцитин-1 був виявлений для клітин U87 Diaz-Carballo D. та співавторами [13], проте його продукція у ракових клітинах може бути причиною дезрегуляції на рівні транскрипції у результаті активації внутрішнього промотора. Таким чином, для вивчення регуляції експресії цих генів на рівні РНК і виявлення альтернативних ізоформ транскриптів цих генів ми обрали стратегію аналізу за допомогою праймерів до різних ділянок генів.

Експресія гена *CHI3L1* детектувалася в обох лініях із праймерами до екзонів 3–5 із деяким зниженням за дії гепарину (рис. 1). Експресія гена, що визначалася цими праймерами, у клітинах U251 була помітно нижчою, ніж у

клітинах лінії U87. Водночас тільки у клітинах лінії U87 отримували ПЛР-продукт до екзонів 8–9. Під час аналізу експресії *CHI3L1* за допомогою праймерів, що охоплюють майже всю кодуючу частину гена з першого до дев'ятого екзону у клітинах U87, не оброблених гепарином, спостерігали фрагмент, менший за розміром від передбачуваного за послідовністю гена. За допомогою біоінформатичного пошуку баз даних NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) та Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) було виявлено можливість альтернативного сплайсингу екзона 3 гена *CHI3L1*. За розміром гіпотетичний сплайсований транскрипт відповідає тому, що ми спостерігаємо в результаті ПЛР. Проте різниця між ПЛР з праймерами до екзонів 3–5 і екзонів 8–9 у клітинах U251 вказує на те, що можливий і інший варіант сплайсингу. Наявність цих великих фрагментів (1038 пн і 836 пн) тільки у варіанті контрольних клітин U87, у яких також спостерігали найбільшу кількість ПЛР-продуктів з іншими парами праймерів, та їхня відсутність в інших реакціях може вказувати на значно нижчу кількість відповідних транскриптів *CHI3L1* і меншу ефективність ампліфікації з цими праймерами, а також на можливу диференційну регуляцію експресії цих двох форм гепарином.

У клітинах U87 за кількістю ПЛР-продукту значний рівень експресії було виявлено для повної форми транскрипта локусу *ERVW-1* (рис. 2). Тільки у клітинах U251 виявлено блокування її експресії за впливу гепарину. Експресія сплайсованої форми не детектувалася в обох лініях клітин ані у контрольних варіантах, ані під час додавання гепарину. Проте експресія

транскрипта лише гена *env* детектувалася і в U87, і в U251 та інгібувалася в обох лініях за додавання гепарину (рис. 2). Це вказує на те, що трансляція протеїну Синцитину-1 може відбуватися у клітинах гліобластом саме з альтернативного транскрипта, експресія якого регулюється гепарином. Крім того, оскільки Синцитин-1 є фузогенним білком, його блокування серед інших факторів може бути причиною і відображати зниження ефективності поглинання раковими клітинами хіміотерапевтичних препаратів за впливу гепарину.

Модельні клітинні лінії гліобластом навіть за різницею своїх міжклітинних характеристик не повною мірою відображають гетерогенність самої пухлини. Для багатьох широко застосованих у дослідженнях ліній клітин (серед яких і U87 та U251) не була виявлена характерна мутація гена *IDH1*, яка часто трапляється у гліобластомах [2]. Для цих ліній гліобластом була характерна підвищена активність теломерази (для U251 в два рази вища, ніж для U87) завдяки однаковій мутації у промоторі гена *hTERT* [2]. Однак виявлено, що клітини U87 демонструють виражені якості стовбурових клітин [14]. Загалом ці клітинні лінії можуть відображати певні відмінні рівноважні стани між крайніми положеннями у процесах диференціації/дедиференціації гліомних клітин, або епітеліально-мезенхімального переходу, які характерні для ракових клітин, і слугувати добрими моделями для вивчення комплексних взаємодій різних молекулярних чинників, зокрема таких, як гепарин, його таргетні гени, або сигнальні шляхи та епігенетичні фактори, які зумовлюють їх функціонування.

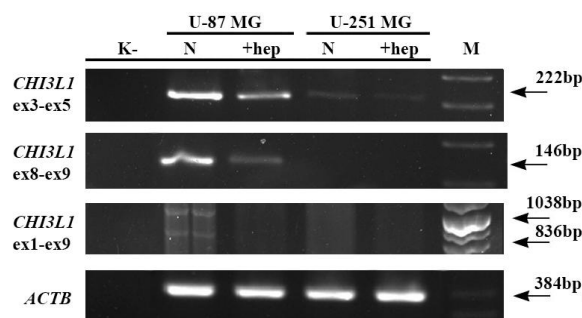


Рис. 1. Лінійспецифічна регуляція гепарином експресії транскриптів гена *CHI3L1* у клітинних лініях U87 та U251 за результатами ПЛР з праймерами до різних екзонів. N – зразки ПЛР до кДНК контрольних клітин; +hep – зразки ПЛР до кДНК клітин, що культивували з додаванням гепарину; K- – негативний контроль ПЛР; M – маркер молекулярних мас.

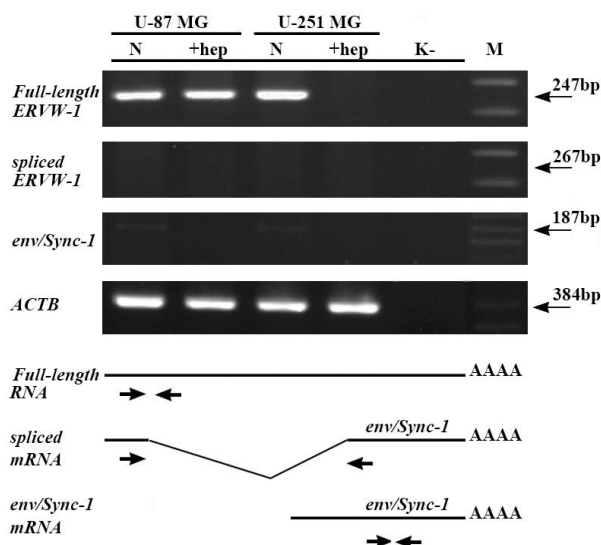


Рис. 2. Лінійспецифічна регуляція гепарином експресії локусу *ERVW-1* у клітинних лініях U87 та U251 за результатами ПЛР з праймерами до різних ділянок, які відображають ампліфікацію повнорозмірної (Full-length), сплайсованої (spliced) РНК локусу *ERVW-1* та альтернативного транскрипта гена *env/Sync-1* локусу. N – зразки ПЛР до кДНК контрольних клітин; +hep – зразки ПЛР до кДНК клітин, що культивували з додаванням гепарину; K- – негативний контроль ПЛР; M – маркер молекулярних мас. Знизу наведено схему розташування пар праймерів для аналізу.

### Висновки

Гепарин комплексно та лінійспецифічно впливає на експресію локусу *ERVW-1* і гена *CHI3L1* у клітинах U87 та U251, ймовірно, із залученням механізму альтернативного сплайсингу. Більш глибоке вивчення регуляції експресії цих генів гепарином є важливим для розуміння механізмів його протипухлинної дії і

ефективного таргетного застосування у терапії різних типів гліом.

Публікація містить результати досліджень, проведених за грантової підтримки за конкурсним проектом № 0117U003595 науково-дослідних робіт молодих учених Національної академії наук України.

### References

- Iwadata Y. Plasticity in Glioma Stem Cell Phenotype and Its Therapeutic Implication. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2018. Vol. 58, № 2. P. 61–70. doi: 10.2176/nmc.ra.2017-0089.
- Patil V., Pal J., Somasundaram K. Elucidating the cancer-specific genetic alteration spectrum of glioblastoma derived cell lines from whole exome and RNA sequencing. *Oncotarget*. 2015. Vol. 6, № 41. P. 43452–43471. doi: 10.18632/oncotarget.6171.
- Schnoor R., Maas S.L., Broekman M.L. Heparin in malignant glioma: review of preclinical studies and clinical results. *J. Neurooncol*. 2015. Vol. 124, № 2. P. 151–156. doi: 10.1007/s11060-015-1826-x.
- Attarha S., Roy A., Westermarck B., Tchougounova E. Mast cells modulate proliferation, migration and stemness of glioma cells through downregulation of GSK3 $\beta$  expression and inhibition of STAT3 activation. *Cell Signal*. 2017. Vol. 37. P. 81–92. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.06.004.
- Ren W., Guo Q., Yang Y., Chen F. bFGF and heparin but not laminin are necessary factors in the mediums that affect NSCs differentiation into cholinergic neurons. *Neurol Res*. 2006. Vol. 28, № 1. P. 87–90. doi: 10.1179/016164106X91933.
- Simard J.M., Tosun C., Ivanova S., Kurland D.B., Hong C., Radecki L., Gisriel C., Mehta R., Schreiber D., Gerzanich V. Heparin reduces neuroinflammation and transsynaptic neuronal apoptosis in a model of subarachnoid hemorrhage. *Transl. Stroke Res*. 2012. Vol. 3, Suppl. 1. P. 155–165. doi: 10.1007/s12975-012-0166-9.
- Areshkov P.O., Avdieiev S.S., Iershov A.V., Kavsan V.M. Stimulation of transient versus sustained ERK1/2 phosphorylation by relative chitinase-like proteins CHI3L1 and CHI3L2 correlates with different kinase localization and biological outcome. *Biopolymers and Cell*. 2011. P. 343–346. URL: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00011F>.
- Kzhyshkowska J., Yin S., Liu T., Riabov V., Mitrofanova I. Role of chitinase-like proteins in cancer. *Biol. Chem*. 2016. Vol. 397, № 3. P. 231–247. doi: 10.1515/hsz-2015-0269.
- Bjerregaard B., Holck S., Christensen I.J., Larsson L.I. Syncytin is involved in breast cancer-endothelial cell fusions. *Cell. Mol. Life Sci*. 2006. Vol. 63, № 3. P. 1906–1911.
- Geng B., Pan J., Zhao T., Ji J., Zhang C., Che Y., Yang J., Shi H., Li J., Zhou H., Mu X., Xu C., Wang C., Xu Y., Liu Z., Wen H., You Q. Chitinase 3-like 1-CD44 interaction promotes metastasis and epithelial-to-mesenchymal transition through  $\beta$ -catenin/Erk/Akt signaling in gastric cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2018. Vol. 37, № 1. P. 208. doi: 10.1186/s13046-018-0876-2.

11. Liu C., Xu J., Wen F., Yang F., Li X., Geng D., Li L., Chen J., Zheng J. Upregulation of syncytin-1 promotes invasion and metastasis by activating epithelial-mesenchymal transition-related pathway in endometrial carcinoma. *Oncotargets Ther.* 2018. Vol. 12. P. 31–40. doi: 10.2147/OTT.S191041.
12. Венельовб М., Трежаловб К., Ковбшовб Д., Вернеровб З., Хрон Т., Куиеровб Д., Нејнар Ј. DNA hypomethylation and aberrant expression of the human endogenous retrovirus ERVWE1/syncytin-1 in seminomas. *Retrovirology.* 2017. Vol. 14, № 1. P. 20. doi: 10.1186/s12977-017-0342-9.
13. Дназ-Карбалло Д., Клејн Ј., Ачикелли А.Н., Вилк С., Сака С., Јастров Н., Веннемутх Г., Дамманн П., Гигер-Пабст У., Хосрауіпур В., Рассов Ј., Ніенен М., Струмберг Д. Cytotoxic stress induces transfer of mitochondria-associated human endogenous retroviral RNA and proteins between cancer cells. *Oncotarget.* 2017. Vol. 8, № 56. P. 95945–95964. doi: 10.18632/oncotarget.21606.
14. Oh S.J., Yang J.I., Kim O., Ahn E.J., Kang W.D., Lee J.H., Moon K.S., Lee K.H., Cho D. Human U87 glioblastoma cells with stemness features display enhanced sensitivity to natural killer cell cytotoxicity through altered expression of NKG2D ligand. *Cancer Cell Int.* 2017. Vol. 17. P. 22. doi: 10.1186/s12935-017-0397-7.

**ANOPRIYENKO O. V.<sup>1</sup>, ARESHKOV P. O.<sup>1</sup>, ZHUK O. V.<sup>1</sup>, SHABLI V. A.<sup>1,2</sup>, SKRYPKINA I. Ya.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of molecular biology and genetics NAS of Ukraine,*

*Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: o.v.anoprienko@imbg.org.ua*

<sup>2</sup> *Institute of cell Therapy,*

*Ukraine, 03680, Kyiv, Komarova ave., 3*

### **INTEGRAL REGULATION OF *CHI3L1* GENE AND *ERVW-1* LOCUS EXPRESSION BY HEPARIN IN THE GLOBLASTOMA CELL LINES U-87 MG AND U-251 MG**

**Aim.** To study the effect of heparin, as a factor of tumor microenvironment, on the expression of *ERVW-1* locus and *CHI3L1* gene, involved in increasing of cancer cells metastatic potential, in U-87 MG (U87) and U-251 MG (U251) glioblastoma cells. **Methods.** U87 and U251 cells were cultured with or without the addition of heparin to the cultural medium. Total cellular RNA was isolated and used for cDNA synthesis and subsequent PCR with primers to different regions of *ERVW-1* and *CHI3L1*. **Results.** Both U87 and U251 cells showed high level of expression of full-length *ERVW-1* RNA. But only in U251 cells inhibition of the full-length transcript by heparin was revealed. Spliced isoform hasn't been detected in any of variants. Though the solely *env* gene transcript expressed at low level in both lines and was inhibited similarly by heparin. Expression of *CHI3L1* has been detected in both lines with primers towards exons 4-5 with some lowering in level under the heparin influence. Only in U87 cells the PCR-fragment with primers to exons 8-9 has been detected. In control U87 cells hypothetical spliced isoform of *CHI3L1* transcript has been revealed with primers to exons 1-9. **Conclusions.** Heparin has complex and cell line-dependent regulation of expression of *ERVW-1* locus and *CHI3L1* gene in the glioblastoma cell lines U87 and U251.

**Keywords:** glioblastoma, heparin, *ERVW-1*, *CHI3L1*.