

doi 10.18699/vjgb-25-82

Интерактом белка HOXB13 в клетках рака простаты: биохимические и функциональные взаимодействия между транскрипционными факторами HOXB13 и TBX3

М.М. Ерохин ¹, Н.Я. Козельчук¹, Р.Х. Зиганшин², В.В. Татарский ¹, Д.А. Четверина ¹

¹ Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

 yermashbio@yandex.ru; daria.chetverina@gmail.com

Аннотация. Транскрипционные факторы относятся к одной из главных групп белков, подавление активности которых приводит к остановке роста опухолей. В различных типах рака экспрессируется определенный набор транскрипционных факторов, которые создают и поддерживают специфические паттерны экспрессии генов. В клетках рака простаты ключевым транскрипционным регулятором является белок HOXB13 (Homeobox B13). Известно, что HOXB13 – важный регулятор эмбрионального развития и терминальной клеточной дифференцировки. Он регулирует транскрипцию многих генов в нормальных и трансформированных клетках простаты, а также способен действовать как пионерный фактор, который открывает хроматин в регуляторных областях генов. Однако данных о белковых партнерах и функциях HOXB13 в клетках рака простаты очень мало. В настоящей работе мы провели поиск белковых партнеров HOXB13 методом иммуоаффинной очистки с последующим высокопроизводительным масс-спектрометрическим анализом (IP/LC-MS), используя в качестве модели клеточную линию рака простаты PC-3. Было обнаружено, что основными партнерами HOXB13 являются транскрипционные факторы с разными типами ДНК-связывающих доменов, в том числе белки TBX3, TBX2, ZFXH4, ZFXH3, RUNX1, NFAT5. С помощью ресурса DepMap мы показали, что один из установленных партнеров, белок TBX3, как и HOXB13, критически важен для роста и пролиферации клеточных линий рака простаты *in vitro*. Анализ отдельных клеточных линий рака простаты выявил, что нокаут обоих генов, *HOXB13* и *TBX3*, приводит к гибели одних и тех же линий: VCaP, LNCaP (clone FGC), PC-3 и 22Rv1. Таким образом, HOXB13 и TBX3 могут совместно рассматриваться как потенциальные мишени для создания специфических ингибиторов, подавляющих рост клеток рака простаты.

Ключевые слова: рак простаты; транскрипционные факторы; регуляция транскрипции; HOXB13; TBX3; TBX2; ZFXH4; ZFXH3; RUNX1; NFAT5

Для цитирования: Ерохин М.М., Козельчук Н.Я., Зиганшин Р.Х., Татарский В.В., Четверина Д.А. Интерактом белка HOXB13 в клетках рака простаты: биохимические и функциональные взаимодействия между транскрипционными факторами HOXB13 и TBX3. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(6):744-752. doi 10.18699/vjgb-25-82

Финансирование. Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 20-74-10099.

HOXB13 interactome in prostate cancer cells: biochemical and functional interactions between the transcription factors HOXB13 and TBX3

М.М. Erokhin ¹, N.Y. Kozelchuk¹, R.H. Ziganshin², V.V. Tatarskiy ¹, D.A. Chetverina ¹

¹ Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

 yermashbio@yandex.ru; daria.chetverina@gmail.com

Abstract. Transcription factors represent one of the major groups of proteins, whose suppression leads to tumor growth arrest. Different types of cancer express a specific set of transcription factors that create and maintain unique patterns of gene expression. In prostate cancer cells, one of the key transcriptional regulators is the HOXB13 (Homeobox B13) protein. HOXB13 is known to be an important regulator of embryonic development and terminal cell differentiation. HOXB13 regulates the transcription of many genes in normal and transformed prostate cells and is also capable of acting as a pioneer factor that opens chromatin in the regulatory regions of genes. However, little is known about the protein partners and functions of HOXB13 in prostate cells. In the present study, we searched for protein partners of HOXB13 by immunoaffinity purification followed by high-throughput mass spectrometric analysis (IP/LC-MS) using the PC-3 prostate cancer cell line as a model. The main partners of HOXB13 were found to be transcription factors with different types of DNA-binding domains, including the TBX3, TBX2, ZFXH4, ZFXH3, RUNX1, NFAT5 proteins. Using the DepMap resource,

we have shown that one of the identified partners, the TBX3 protein is as critical for the growth and proliferation of prostate cancer cell lines *in vitro* as HOXB13. Analysis of individual prostate cancer cell lines revealed that knockout of both genes, *HOXB13* and *TBX3*, leads to the death of the same lines: VCaP, LNCaP (clone FGC), PC-3 and 22Rv1. Thus, *HOXB13* and *TBX3* can be considered together as potential targets for the development of specific inhibitors that suppress prostate cancer cell growth.

Key words: prostate cancer; transcription factors; regulation of transcription; *HOXB13*; *TBX3*; *TBX2*; *ZFNH4*; *ZFNH3*; *RUNX1*; *NFAT5*

For citation: Erokhin M.M., Kozelchuk N.Y., Ziganshin R.H., Tatarskiy V.V., Chetverina D.A. *HOXB13* interactome in prostate cancer cells: biochemical and functional interactions between the transcription factors *HOXB13* and *TBX3*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(6):744-752. doi 10.18699/vjgb-25-82

Введение

Рак простаты занимает важное место в причинах мужской смертности от онкологических заболеваний. Это один из наиболее часто встречающихся типов онкопатологий у мужчин (Siegel et al., 2023). В настоящее время самым распространенным способом химического воздействия на клетки рака простаты является блокирование андрогенного рецептора, AR. Однако в большинстве случаев опухолевые клетки через некоторое время приобретают устойчивость к данному типу терапии, что характеризуется образованием «кастрационно-резистентного рака предстательной железы» (КРПРЖ – castration-resistant prostate cancer, CRPC) (Crona, Whang, 2017). В связи с этим актуален поиск мишеней для создания новых ингибиторов опухолевой прогрессии при раке простаты.

Транскрипционный фактор *HOXB13* охарактеризован как потенциальная мишень при терапии рака простаты. Данный белок кодируется одним из 39 генов семейства гомеозисных факторов (содержат ДНК-связывающий HOX-домен, называемый также гомеобоксом), которые контролируют транскрипционные каскады в различных тканях в норме и при патологиях (Feng et al., 2021; Hubert, Wellik, 2023). *HOXB13* – это пионерный фактор; его сайты связывания часто перекрываются с сайтами *FOXA1*, *GATA2* и других ДНК-связывающих белков в клеточных линиях, происходящими из тканей простаты (Hankey et al., 2020; Pomerantz et al., 2020). Повышение уровня экспрессии *HOXB13* наблюдается примерно в 85 % случаев аденокарциномы простаты и коррелирует с резистентностью к AR-таргетной терапии, метастазированием и рецидивами в лечении опухоли (Zabalza et al., 2015; Yao et al., 2019; Weiner et al., 2021). Также было показано, что мутации *HOXB13* в геноме опухолевых клеток связаны с негативным прогнозом выживаемости пациентов при раке простаты (Ewing et al., 2012; Cai et al., 2015; Adashek et al., 2020).

Несмотря на важную роль *HOXB13* в пролиферации раковых клеток простаты, его биохимические и функциональные свойства изучены недостаточно. В настоящем исследовании проведен анализ интерактома белка *HOXB13* в клеточной линии рака простаты PC-3. Установлено, что одним из партнеров *HOXB13* является белок *TBX3*. Оба белка, *HOXB13* и *TBX3*, необходимы для роста и пролиферации одних и тех же клеточных линий рака простаты. Таким образом, *HOXB13* и его партнер *TBX3* могут рассматриваться как потенциальные мишени при создании ингибиторов для онкотерапии рака простаты.

Материалы и методы

Иммунопреципитация. Эксперименты по иммуноаффинной очистке были проведены как описано ранее (Chetverina et al., 2022). Ядерный экстракт получен из клеток линии PC-3. 10^9 клеток были дважды промыты в охлажденном во льду буфере PBS и суспендированы в 10 мл ледяного сахарозного буфера (10 mM Tris, pH 7.5, 10 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА, 1 mM ДТТ, 250 mM сахарозы, коктейль ингибиторов протеаз без ЭДТА). Клетки гомогенизировали с помощью пестика Dounce и инкубировали на льду 10 мин. Затем ядра осаждали центрифугированием при 3000g, +4 °C в течение 10 мин. Осадок суспендировали в 1 мл буфера IP-500 (10 mM Tris, pH 7.5, 500 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА, 1 mM ДТТ, 0.1 % NP-40, 10 % глицерин, коктейль ингибиторов протеаз без ЭДТА), гомогенизировали с помощью пестика Dounce и инкубировали 1 ч при +4 °C на ротаторе. Лизаты осветляли центрифугированием при 18000g, +4 °C в течение 10 мин. Далее ядерный экстракт был разбавлен до концентрации NaCl 150 mM с использованием буфера IP-0 (10 mM Tris, pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА, 1 mM ДТТ, 0.1 % NP-40, 10 % глицерин, коктейль ингибиторов протеаз без ЭДТА).

Моноклональные антитела против *HOXB13* (EPR17371, ab201682, Abcam) либо иммуноглобулины неиммунизированных кроликов (Jackson ImmunoResearch #011-000-002), используемые в качестве отрицательного контроля, были ковалентно пришиты к сефарозе A (Pierce) с помощью DMP (Sigma). Ядерный экстракт, содержащий 150 mM NaCl, инкубировали с антителами и сефарозой 14 ч при +4 °C. После процедур отмывок полученные иммунопреципитаты были элюированы с помощью буфера, содержащего 2 % SDS, 100 mM Tris, pH 8.0, 0.5 mM ЭДТА. Элюированные иммунопреципитаты осаждали с помощью ТХУ и далее анализировали методом жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии (liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC-MS).

Масс-спектрометрический анализ проб. Анализ полученных образцов проводили, как описано ранее в (Chetverina et al., 2022). Буфер для восстановления и алкилирования с дезоксихолатом натрия (SDC), pH 8.5, содержал 100 mM Tris, 1 % (w/v) SDC, 10 mM ТСЕР и 20 mM 2-хлор-ацетамида. По 20 мкл такого буфера добавляли к 20 мкг каждого образца белка. Каждый образец обрабатывали в ультразвуковой водяной бане в течение 1 мин, нагревали 10 мин при 95 °C, охлаждали до комнатной температуры и добавляли равный объем раствора трипсина в 100 mM Tris,

pH 8.5, в соотношении 1:50 (w/w). Реакцию оставляли на ночь при 37 °C, затем к пептидам добавляли 40 мкл 2 % трифторуксусной кислоты (TFA), смешивали с 80 мкл этилацетата и очищали на SDB-RPS StageTip. После двукратной промывки смесью 1 % TFA/этилацетат (1:1) и однократной промывки 0.2 % TFA пептиды элюировали в чистую пробирку с помощью буфера, содержащего 50 % ацетонитрила/5 % аммиака. Собранный материал высушивали в вакууме и хранили при температуре –80 °C. Перед дальнейшим анализом пептиды растворяли в буфере, содержащем 2 % ацетонитрил и 0.1 % TFA.

Необработанные данные и подробный протокол экспериментов по жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии находятся в открытом доступе в депозитарии PRIDE (<http://www.ebi.ac.uk/pride>), номер проекта PXD059115. Топ-20 ядерных белков были отобраны по следующему параметру: HOXB13 Spectral count/IgG Spectral count >= 2. Для проведения GO-анализа использовался ресурс TNMplot (Bartha, Györfy, 2021).

Анализ чувствительности раковых клеточных линий и уровня экспрессии генов в клинических образцах проводился на основе базы данных DepMap (<https://depmap.org/portal/>). Для анализа данных, полученных методом CRISPR, использовали версию CRISPR (DepMap Public 24Q4+Score, Chronos), для полученных методом RNAi – версию RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2).

Экспрессию генов в образцах опухоли и соответствующих нормальных тканях оценивали с помощью теста Манна–Уитни, база данных TNMplot (<https://tnmplot.com>), сведения из Cancer Genome Atlas (TCGA) и репозитория Genotype-Tissue Expression (GTEx) (Bartha, Györfy, 2021).

Выживаемость пациентов анализировали с использованием базы данных UCSC Xena (<https://xena.ucsc.edu/>) (Goldman et al., 2020), когорты TCGA Prostate Cancer (PRAD), Illumina HiSeq 2000 RNA (dataset ID – TCGA.PRAD.sampleMap/HiSeqV2) и фильтр “Primary tumor”.

Результаты

Интерактом фактора HOXB13 в клетках рака простаты линии PC-3

Поиск белковых партнеров фактора HOXB13 был осуществлен с помощью иммуноаффинной очистки (IP) с последующим анализом образцов методом высокопроизводительной масс-спектрометрии (IP/LC-MS). В качестве модели мы использовали линию рака простаты PC-3, в которой детектируется высокий уровень экспрессии гена *HOXB13*. Из клеток данной линии выделили ядерный экстракт, который был проинкубирован с антителами против HOXB13 или с IgG неиммунизированного животного (отрицательный контроль), ковалентно связанными с сефарозой А. После иммунопреципитации и серии отмывок белки были элюированы с сефарозных бусин с помощью SDS-содержащего буфера и проанализированы методом масс-спектрометрического анализа LC-MS. На рис. 1, А, Б представлены 20 белков с наибольшим обогащением согласно результатам IP/LC-MS-анализа.

GO-анализ 20 ядерных белков с наибольшими обогащениями сигналов в масс-спектрометрическом анализе

показал, что многие из них (11 из 20) представлены ДНК-связывающими факторами транскрипции (см. рис. 1, В).

Два белка-гомолога, ZFNХ4 и ZFNХ3 (zinc finger homeobox 3 и 4), имеют в своей структуре по 17 некластеризованных мотивов «цинковые пальцы» C2H2-типа, а также по 4 ДНК-связывающих домена типа гомеобокс (НОХ-домены) (см. рис. 1, А). Несколько некластеризованных мотивов «цинковые пальцы» C2H2-типа содержит также белок TRPS1. Белок HMG20A содержит ДНК-связывающий домен типа “High mobility group”. Три фактора, MGA (MAX gene-associated protein) и два белка-гомолога TBX3 и TBX2 (T-box transcription factors), включают ДНК-связывающий домен типа T-box. Белок TCF20 имеет A.T.hook домен, RUNX1 – Runt домен, NFAT5 – RHD домен, а MRE11 – Mre11 домен (см. рис. 1, А).

Таким образом, многие топовые белковые партнеры HOXB13 являются транскрипционными факторами с разными типами ДНК-связывающих доменов.

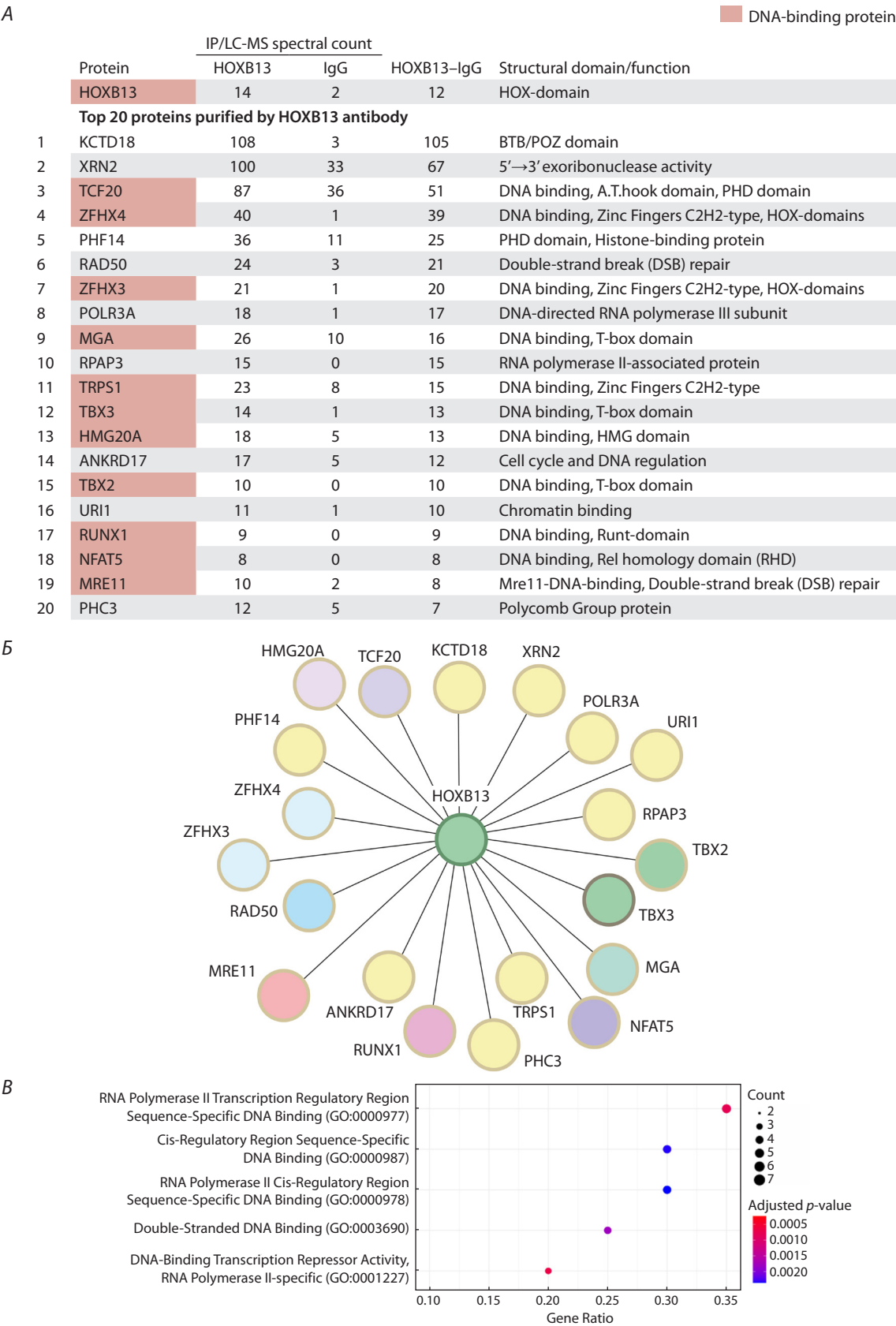
Анализ базы данных DepMap:

продукты генов HOXB13 и TBX3 наиболее значимы для пролиферации клеточных линий рака простаты

Для определения функциональной значимости выявленных партнеров HOXB13 на следующем этапе мы провели поиск типов рака, наиболее чувствительных к нокауту (CRISPR) или нокдауну генов (RNAi), кодирующих HOXB13 и его белковые партнеры, используя базу данных DepMap (см. таблицу). В проекте DepMap суммированы данные скрининга зависимости уровня пролиферации опухолевых клеток различной этиологии от подавления активности индивидуальных генов методами CRISPR или RNAi (Tsherniak et al., 2017; Vazquez, Sellers, 2021). Вероятность зависимости (Dependency) каждой клеточной линии от определенного гена выражена в виде количественного показателя «эффект гена» (Gene effect): чем ниже этот параметр, тем выше уровень гибели клеток рассматриваемой клеточной линии при инактивации соответствующего гена.

Анализ данных DepMap выявил, что клеточные линии разных типов опухолей по-разному реагируют на деpleцию тестируемых генов. Наиболее важно, что нарушение активности одного из факторов, гена *TBX3*, как и гена *HOXB13*, приводит к преимущественной гибели клеточных линий рака простаты. При этом нарушение роста и пролиферации опухолевых клеток простаты наблюдается как при нокауте (CRISPR), так и при нокдауне (RNAi) генов *HOXB13* и *TBX3* (рис. 2, А, Б, см. таблицу).

Для того чтобы понять, какие именно клеточные линии наиболее чувствительны к делециям генов *HOXB13* и *TBX3*, они были проанализированы по отдельности (см. рис. 2, В). В ресурсе DepMap имеются данные о влиянии CRISPR-опосредованного нокаута в 10 линиях, происходящих из тканей простаты. Пять из них, VCaP, LNCaP (clone FGC), PC-3, 22Rv1 и DU145, получены из агрессивных аденокарцином. Линии P4E6, Shmac 4, Shmac 5 выделены из клеток высокодифференцированных нематастатических карцином простаты, дополнительно immortalizованных с помощью экспрессии гена *E6 HPV* (Lang et al., 2006). WPE1-NA22 была получена из нормальных клеток простаты линии RWPE-1 путем трансформации



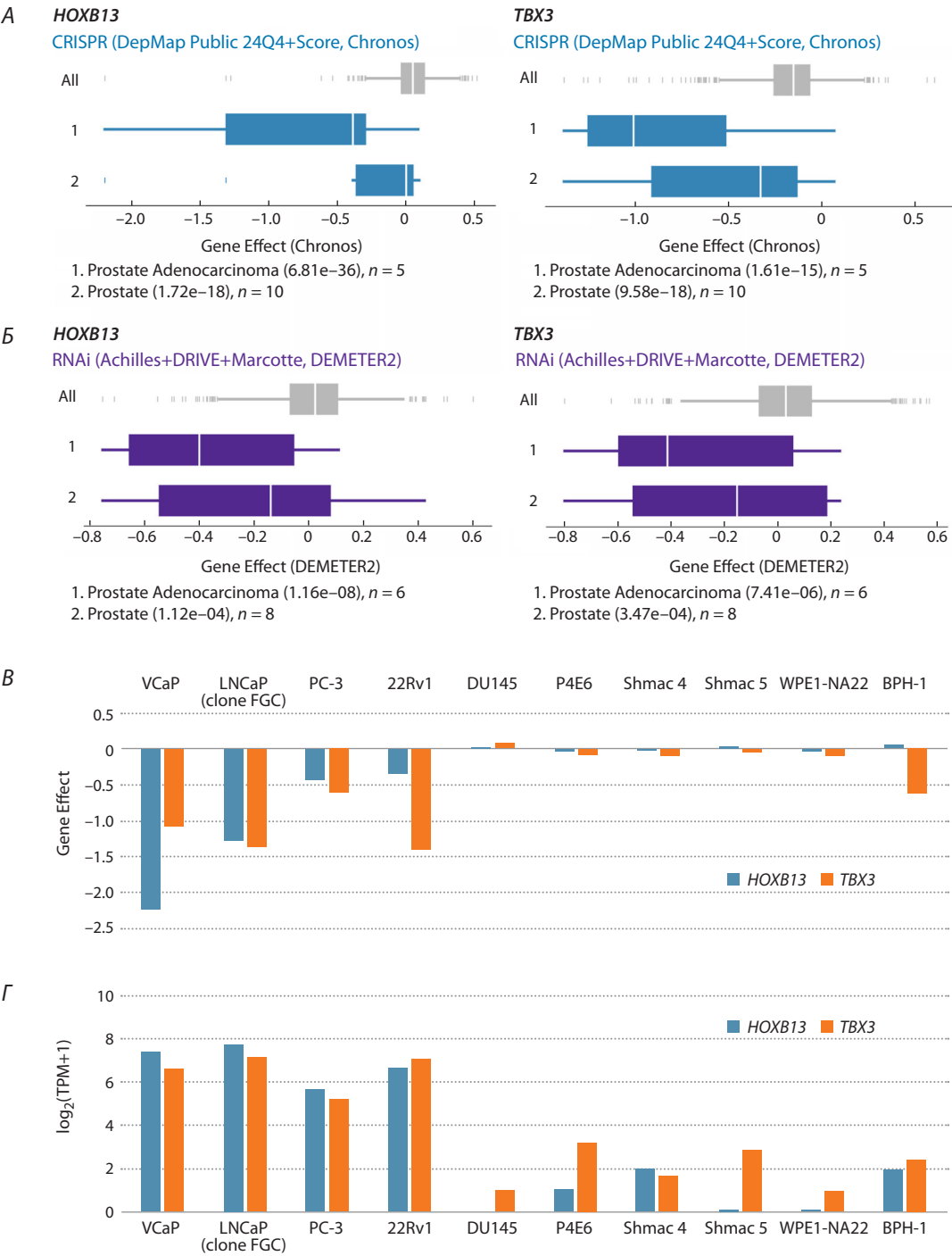


Рис. 2. Клеточные линии рака простаты наиболее чувствительны к нокауту и нокадауну генов *HOXB13* и *TBX3*. Анализ выполнен с использованием базы данных DepMap.

A – нокаут (CRISPR) генов *HOXB13* и *TBX3* специфично влияет на рост и жизнеспособность клеток, происходящих из простаты. Эффекты удаления тестируемого гена для всех линий клеток окрашены в серый цвет (всего 1178 линий клеток), эффекты удаления тестируемого гена для клеточных линий, происходящих из простаты, – в синий. По оси абсцисс представлены значения генетических эффектов (Gene Effect), отражающие уровень пролиферации раковых клеток при делеции тестируемого гена: чем меньше значение данного показателя, тем большее негативное влияние на рост клеток оказывает ингибирование активности гена. Белый пробел означает медианное значение показателя Gene Effect. Анализ DepMap выявляет две наиболее специфично чувствительные к нокауту группы линий: **1** – средний эффект 5 линий, соответствующих аденокарциноме простаты; **2** – средний эффект 10 клеточных линий, происходящих из простаты, включая линии аденокарциномы.

Б – нокадаун (RNAi, фиолетовый цвет) влияет на рост и жизнеспособность клеток, происходящих из простаты. Две наиболее специфично чувствительные к нокауту группы линий: **1** – средний эффект 6 линий аденокарциномы простаты; **2** – средний эффект 8 клеточных линий, происходящих из простаты, включая линии аденокарциномы.

В – влияние нокаута (CRISPR) генов *HOXB13* и *TBX3* на ингибирование пролиферации 10 клеточных линий, происходящих из простаты, проанализированных по отдельности. По оси ординат указаны значения параметра Gene Effect при делеции генов методом CRISPR.

Г – уровень транскрипции (выражен в значениях $\log_2(\text{TPM}+1)$) в 10 клеточных линиях, происходящих из тканей простаты. Анализ выполнен без нокаута генов.

Наиболее чувствительные к нокауту (CRISPR) или нокдауну (RNAi) типы опухолей при деpleции *HOXB13* и его партнеров согласно базе данных DepMap

№ п/п	Ген	CRISPR knockout	RNAi knockdown	№ п/п	Ген	CRISPR knockout	RNAi knockdown
Контроль	<i>HOXB13</i>	Prostate	Prostate	11	<i>TRPS1</i>	Breast	Breast
1	<i>KCTD18</i>	Ovary	Kidney	12	<i>TBX3</i>	Prostate	Prostate
2	<i>XRN2</i>	No	No	13	<i>HMG20A</i>	No	No
3	<i>TCF20</i>	No	No	14	<i>ANKRD17</i>	Rhabdomyosarcoma	Breast
4	<i>ZFHX4</i>	No	No	15	<i>TBX2</i>	Neuroblastoma	Rhabdoid Cancer
5	<i>PHF14</i>	No	Mesothelioma	16	<i>URI1</i>	No	Head and Neck
6	<i>RAD50</i>	Lymphoma	No	17	<i>RUNX1</i>	Lymphoma	Lymphoma
7	<i>ZFHX3</i>	Rhabdoid Cancer	No	18	<i>NFAT5</i>	Stomach	Melanoma
8	<i>POLR3A</i>	No	No	19	<i>MRE11</i>	No	No
9	<i>MGA</i>	Head and Neck	Solid	20	<i>PHC3</i>	Ovary	No
10	<i>RPAP3</i>	Head and Neck	No				

Примечание. Обозначение "No" указывает, что тип опухоли, клетки которого были бы наиболее чувствительны к инактивации данного гена, не выявлен.

химическим канцерогеном (MNU) (Webber et al., 2001), BPH-1 – из нетрансформированных эпителиальных клеток простаты путем иммортализации большим антигеном вируса SV40 (Hayward et al., 1995).

Высокой чувствительностью к делеции генов как *HOXB13*, так и *TBX3* обладали четыре из пяти клеточных линий аденокарциномы простаты: VCaP, LNCaP (clone FGC), PC-3 и 22Rv1. В то же время делеция *HOXB13* и *TBX3* не являлась значимой для роста и пролиферации клеточных линий DU145, WPE1-NA22, P4E6, Shmac 4, Shmac 5. Клетки линии BPH-1 обладали чувствительностью к делеции *TBX3*, но не *HOXB13*. Анализ экспрессии генов *HOXB13* и *TBX3* в исследуемых линиях (данные ресурса DepMap) показал, что наиболее высокий уровень транскрипции этих факторов детектируется в линиях VCaP, LNCaP (clone FGC), PC-3 и 22Rv1 (см. рис. 2, Г), чувствительных к нокауту обоих генов. Таким образом, продукты генов *HOXB13* и *TBX3* преимущественно необходимы для пролиферации клеточных линий, происходящих из образцов аденокарцином простаты.

На следующем этапе мы проанализировали уровень транскрипции генов *HOXB13* и *TBX3* в клинических образцах с помощью ресурса TNMplot. Транскрипция гена *HOXB13* в норме ограничена тканями простаты (рис. 3, А). При патологии высокий уровень транскриптов гена *HOXB13* наблюдается в опухолевых тканях простаты и прямой кишки. Ген *TBX3* транскрибируется в большем числе тканей, при этом наиболее высокий уровень экспрессии данного фактора характерен для надпочечников, простаты и щитовидной железы (см. рис. 3, Б). В опухолевых тканях часто происходит снижение уровня транскрипции *TBX3* по сравнению с нетрансформированными образцами, что наблюдается и в случае рака простаты. Подробные данные изменений уровней экспрессии генов *HOXB13* и *TBX3* в здоровых и трансформированных тканях простаты представлены на рис. 3, В. Экспрессия гена *HOXB13* значительно и достоверно повышена ($FC = 3.8$, $p\text{-value} = 2.28 \times 10^{-69}$), тогда как уровень транскрипции *TBX3* достоверно снижается ($FC = 0.84$, $p\text{-value} = 2.47 \times 10^{-04}$).

В то же время достоверных корреляций уровней транскрипции генов *HOXB13* и *TBX3* с продолжительностью жизни пациентов с аденокарциномой простаты выявлено не было (см. рис. 3, Г).

Обсуждение

В проведенном исследовании с помощью метода IP/LC-MS были определены белковые партнеры фактора *HOXB13* в клеточной линии рака простаты PC-3, многие из которых относятся к ДНК-связывающим белкам.

Одним из установленных партнеров *HOXB13* является белок *TBX3*, имеющий в своей структуре ДНК-связывающий домен T-box типа. Анализ данных портала DepMap показал, что нокаут (CRISPR) и нокдаун (RNAi) как гена *HOXB13*, так и гена *TBX3* наиболее значимо блокирует рост и пролиферацию клеточных линий, происходящих из аденокарцином простаты. Уровень транскрипции гена *HOXB13*, но не *TBX3*, достоверно выше в клинических образцах, полученных от пациентов с аденокарциномой простаты, по сравнению с образцами здоровых тканей простаты. Вместе с тем корреляции между повышенным уровнем транскрипции гена *HOXB13* или *TBX3* и негативным прогнозом общей выживаемости пациентов с аденокарциномой простаты не выявлено.

Можно предположить, что белки *HOXB13* и *TBX3* тесно связаны функционально и участвуют в одинаковых каскадах регуляции транскрипции. Потенциально, совместное ингибирование активностей *HOXB13* и *TBX3* может оказывать более сильное ингибирующее влияние на пролиферацию клеток рака простаты, чем инактивация белков по отдельности. Для фактора *TBX3* ранее было показано, что он может подавлять транскрипцию генов-супрессоров опухолей, таких как $p14^{ARF}$ (Lingbeek et al., 2002; Yarosh et al., 2008). Возможно, кооперация между *HOXB13* и *TBX3* способна усиливать репрессию транскрипции отдельных онкосупрессоров. Роль *TBX3* достаточно подробно исследована в опухолях печени и молочной железы (Khan et al., 2020), однако данные о функциях этого фактора в клетках рака простаты на сегодня ограничены одним ис-

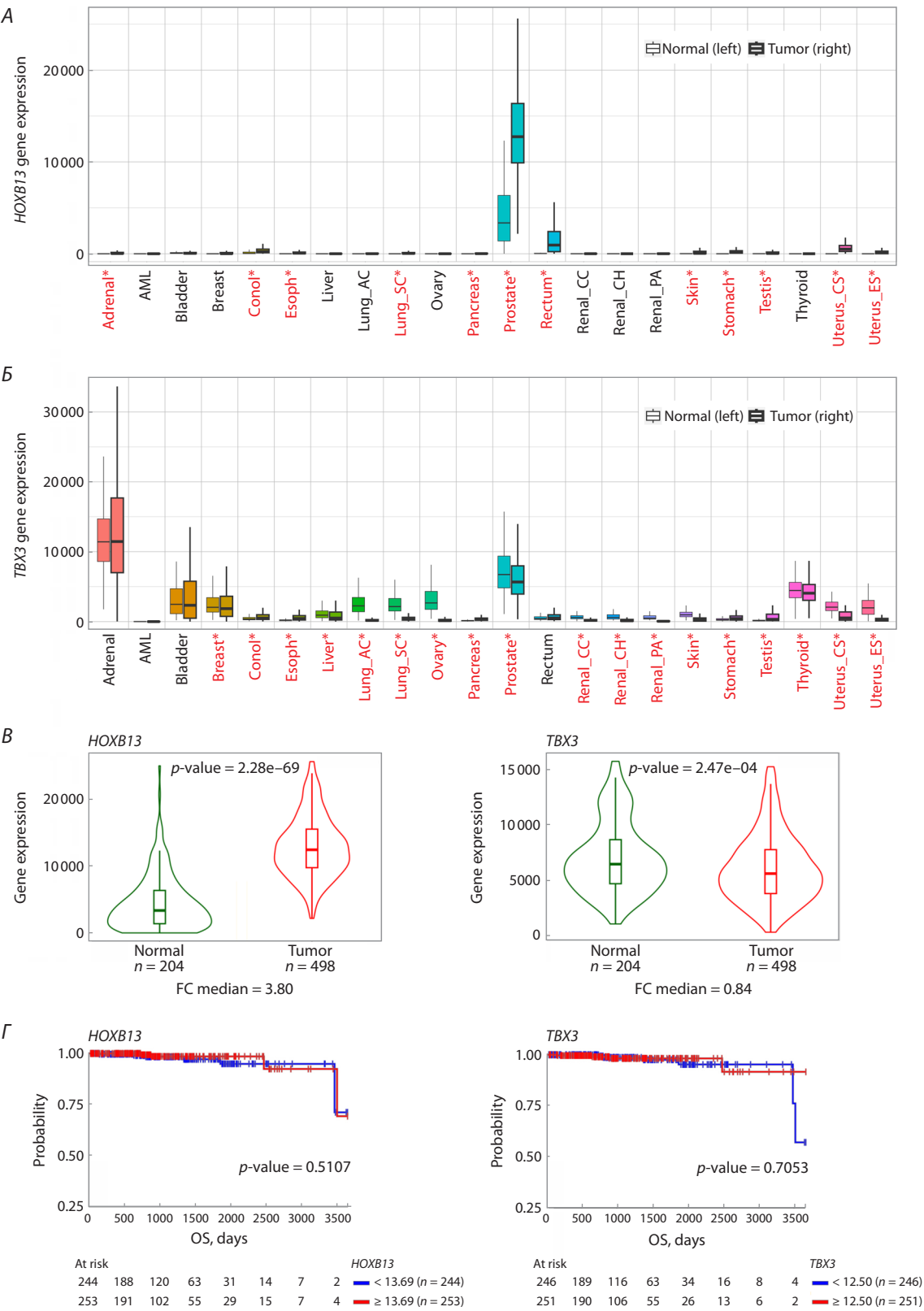


Рис. 3. Уровень транскрипции генов *HOXB13* и *TBX3* в клинических образцах.
А, Б – дифференциальная экспрессия генов в нормальных (слева) и опухолевых (справа) образцах разных тканей, анализ проведен с помощью ресурса TNMplot. Красным цветом отмечены случаи с p -value < 0.05 (тест Манна–Уитни) и экспрессией > 10 в опухолевых или нормальных образцах. В – изменения уровня транскрипции генов *HOXB13* и *TBX3* представлены в виде скрипичных диаграмм. p -value, тест Манна–Уитни; FC (fold change median) – медиана изменения экспрессии, анализ проведен с помощью ресурса TNMplot. Г – корреляции между уровнем транскрипции генов *HOXB13* и *TBX3* и прогнозом общей продолжительности (OS) жизни пациентов в клинических образцах; анализ проведен с помощью ресурса UCSC Xena. Красным цветом выделены когорты с высокой экспрессией генов, синим – с низкой.

следованием (Hwang et al., 2022). Используя клеточную линию LNCaP, J.H. Hwang с коллегами показали, что в интерактоме транскрипционного кофактора CREB5 детектируются различные ДНК-связывающие белки, в том числе TBX3, HOXB13, FOXA1 и AR. Нокаут TBX3, как и FOXA1, приводил к гибели клеток линии LNCaP.

Два белковых партнера фактора HOXB13, белки-гомологи ZFHX4 и ZFHX3, содержат в своей структуре четыре гомеобоксных домена. Известно, что гомеобоксные домены могут образовывать друг с другом белковые контакты (Ortiz-Lombardia et al., 2017). Возможно, гомеодомен HOXB13 и гомеодомены ZFHX4/ZFHX3 способны взаимодействовать напрямую, что необходимо проверить в будущем.

Ранее с использованием клеточной линии VCaP, происходящей из рака простаты, было установлено, что HOXB13 преципитируется с белком EED, компонентом репрессорного комплекса PRC2 (Cao et al., 2014). Авторы также показали, что EED эффективно взаимодействует и с другим Polycomb-комплексом, PRC1. В нашей работе мы не обнаружили компоненты комплекса PRC2 в иммунопреципитате HOXB13, однако детектировались два других Polycomb-фактора: белки PHC3 и RUNX1. PHC3, как и его гомологи PHC 1 и 2, является коровым компонентом подкомплекса PRC1, называемым cPRC1 (Schuetengruber et al., 2017), тогда как для транскрипционного фактора RUNX1 была ранее показана возможность взаимодействия с Polycomb-фактором BMI1 (Yu et al., 2012). Возможно, HOXB13 участвует в регуляции транскрипции вместе с репрессорами группы Polycomb, но для изучения данного вопроса необходимо провести дополнительные исследования.

На сегодняшний день большое внимание уделяется поиску новых мишеней для направленной (таргетной) терапии онкологических заболеваний, при этом одними из перспективных типов мишеней являются транскрипционные факторы (Bouhrel et al., 2015; Hagenbuchner, Ausserlechner, 2016; Lambert et al., 2018). В последнее время появляется все больше данных, свидетельствующих о ключевой роли ДНК-связывающих транскрипционных факторов в процессах развития злокачественных опухолей (Vishnoi et al., 2020; Zhang et al., 2020). К примеру, анализ базы DepMap выявляет транскрипционные факторы как класс генов, инактивация которых критически важна для пролиферации опухолевых клеток (Chetverina et al., 2023). Описан ряд агентов, позволяющих ингибировать ДНК-связывающую активность транскрипционных факторов, что делает актуальным их изучение в качестве потенциальных мишеней для лечения онкопатологий (Bushweller, 2019; Li et al., 2022; Zhuang et al., 2022; Xie et al., 2023).

Полученные в настоящем исследовании результаты показывают, что большая часть топовых белков интерактома HOXB13 представлена ДНК-связывающими факторами. Свойство транскрипционных факторов взаимодействовать с другими ДНК-связывающими белками, вероятно, является одним из общих механизмов регуляции транскрипции генов как у млекопитающих (Jolma et al., 2013, 2015), так и у других многоклеточных (Erokhin et al., 2018). По всей видимости, множественные взаимодействия между транскрипционными факторами позволяют им образо-

вывать упорядоченные макрокомплексы, которые узнают не только единичные, часто вырожденные сайты связывания для отдельного фактора, но и более протяженные области ДНК, состоящие из набора мотивов нескольких белков. Способность ДНК-связывающих белков к взаимодействию может быть ключевой для специфичного выбора мест посадки регуляторных комплексов на хроматин. Модулирование возможности отдельных ДНК-связывающих белков рекрутироваться на хроматин является способом более локального воздействия на систему регуляции экспрессии генов, что делает транскрипционные факторы перспективной мишенью для подбора различных противоопухолевых компонентов.

Закключение

Полученные данные позволяют сделать следующие основные выводы. 1. Главные партнеры фактора HOXB13 представлены транскрипционными факторами с разными типами ДНК-связывающих доменов. 2. Клеточные линии, происходящие из образцов аденокарциномы простаты, наиболее чувствительны к делеции генов *HOXB13* и *TBX3*. 3. Подавление активностей генов *HOXB13* и *TBX3* приводит к остановке роста и пролиферации одних и тех же клеточных линий аденокарциномы простаты. Дальнейшие исследования необходимы для понимания эффектов совместного ингибирования HOXB13 и TBX3 *in vitro* и *in vivo*.

Список литературы / References

- Adashek J.J., Leonard A., Roszik J., Menta A.K., Genovese G., Subbiah V., Msaouel P. Cancer genetics and therapeutic opportunities in urologic practice. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3):710. doi 10.3390/cancers12030710
- Bartha Á., Györfy 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
- Bouhrel M.A., Lambert M., David-Cordonnier M.-H. Targeting transcription factor binding to DNA by competing with DNA binders as an approach for controlling gene expression. *Curr Top Med Chem*. 2015;15(14):1323-1358. doi 10.2174/1568026615666150413154713
- Bushweller J.H. Targeting transcription factors in cancer – from undruggable to reality. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(11):611-624. doi 10.1038/s41568-019-0196-7
- Cai Q., Wang X., Li X., Gong R., Guo X., Tang Y., Yang K., Niu Y., Zhao Y. Germline HOXB13 p.Gly84Glu mutation and cancer susceptibility: a pooled analysis of 25 epidemiological studies with 145,257 participants. *Oncotarget*. 2015;6(39):42312-42321. doi 10.18632/oncotarget.5994
- Cao Q., Wang X., Zhao M., Yang R., Malik R., Qiao Y., Poliakov A., ... Feng F.Y., Kalantry S., Qin Z.S., Dhanasekaran S.M., Chinnaiyan A.M. The central role of EED in the orchestration of polycomb group complexes. *Nat Commun*. 2014;5:3127. doi 10.1038/ncomms4127
- Chetverina D., Vorobyeva N.E., Mazina M.Y., Fab L.V., Lomaev D., Golovkina A., Mogila V., Georgiev P., Ziganshin R.H., Erokhin M. Comparative interactome analysis of the PRE DNA-binding factors: purification of the Combgap-, Zeste-, Psq-, and Adfl-associated proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2022;79(7):353. doi 10.1007/s00018-022-04383-2
- Chetverina D., Vorobyeva N.E., Györfy B., Shtil A.A., Erokhin M. Analyses of genes critical to tumor survival reveal potential 'super-targets': focus on transcription. *Cancers (Basel)*. 2023;15(11):3042. doi 10.3390/cancers15113042

- Crona D.J., Whang Y.E. Androgen receptor-dependent and -independent mechanisms involved in prostate cancer therapy resistance. *Cancers (Basel)*. 2017;9(6):67. doi 10.3390/cancers9060067
- Erokhin M., Georgiev P., Chetverina D. *Drosophila* DNA-binding proteins in polycomb repression. *Epigenomes*. 2018;2(1):1. doi 10.3390/epigenomes2010001
- Ewing C.M., Ray A.M., Lange E.M., Zuhlke K.A., Robbins C.M., Tembe W.D., Wiley K.E., ... Montie J.E., Xu J., Carpten J.D., Isaacs W.B., Cooney K.A. Germline mutations in HOXB13 and prostate-cancer risk. *N Engl J Med*. 2012;366(2):141-149. doi 10.1056/NEJMoa1110000
- Feng Y., Zhang T., Wang Y., Xie M., Ji X., Luo X., Huang W., Xia L. Homeobox genes in cancers: from carcinogenesis to recent therapeutic intervention. *Front Oncol*. 2021;11:770428. doi 10.3389/fonc.2021.770428
- Goldman M.J., Craft B., Hastie M., Repčeka K., McDade F., Kamath A., Banerjee A., Luo Y., Rogers D., Brooks A.N., Zhu J., Haussler D. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nat Biotechnol*. 2020;38(6):675-678. doi 10.1038/s41587-020-0546-8
- Hagenbuchner J., Ausserlechner M.J. Targeting transcription factors by small compounds – current strategies and future implications. *Biochem Pharmacol*. 2016;107:1-13. doi 10.1016/j.bcp.2015.12.006
- Hankey W., Chen Z., Wang Q. Shaping chromatin states in prostate cancer by pioneer transcription factors. *Cancer Res*. 2020;80(12):2427-2436. doi 10.1158/0008-5472.CAN-19-3447
- Hayward S.W., Dahiya R., Cunha G.R., Bartek J., Deshpande N., Narayan P. Establishment and characterization of an immortalized but non-transformed human prostate epithelial cell line: BPH-1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1995;31(1):14-24. doi 10.1007/BF02631333
- Hubert K.A., Wellik D.M. Hox genes in development and beyond. *Development*. 2023;150(1):dev192476. doi 10.1242/dev.192476
- Hwang J.H., Arafeh R., Seo J.-H., Baca S.C., Ludwig M., Arnoff T.E., Sawyer L., ... Kregel S., Van Allen E.M., Drake J.M., Freedman M.L., Hahn W.C. CREB5 reprograms FOXA1 nuclear interactions to promote resistance to androgen receptor-targeting therapies. *eLife*. 2022;11:e73223. doi 10.7554/eLife.73223
- Jolma A., Yan J., Whittington T., Toivonen J., Nitta K.R., Rastas P., Morgunova E., ... Hughes T.R., Lemaire P., Ukkonen E., Kivioja T., Taipale J. DNA-binding specificities of human transcription factors. *Cell*. 2013;152(1-2):327-339. doi 10.1016/j.cell.2012.12.009
- Jolma A., Yin Y., Nitta K.R., Dave K., Popov A., Taipale M., Enge M., Kivioja T., Morgunova E., Taipale J. DNA-dependent formation of transcription factor pairs alters their binding specificity. *Nature*. 2015;527(7578):384-388. doi 10.1038/nature15518
- Khan S.F., Damerell V., Omar R., Du Toit M., Khan M., Maranyane H.M., Mlaza M., Bleloch J., Bellis C., Sahm B.D.B., Peres J., Aruljothi K.N., Prince S. The roles and regulation of TBX3 in development and disease. *Gene*. 2020;726:144223. doi 10.1016/j.gene.2019.144223
- Lambert M., Jambon S., Depauw S., David-Cordonnier M.-H. Targeting transcription factors for cancer treatment. *Molecules*. 2018;23(6):1479. doi 10.3390/molecules23061479
- Lang S.H., Smith J., Hyde C., Macintosh C., Stower M., Maitland N.J. Differentiation of prostate epithelial cell cultures by matrigel/stromal cell glandular reconstruction. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2006;42(8):273-280. doi 10.1290/0511080.1
- Li Y., Song J., Zhou P., Zhou J., Xie S. Targeting undruggable transcription factors with PROTACs: advances and perspectives. *J Med Chem*. 2022;65(15):10183-10194. doi 10.1021/acs.jmedchem.2c00691
- Lingbeek M.E., Jacobs J.J.L., van Lohuizen M. The T-box repressors *TBX2* and *TBX3* specifically regulate the tumor suppressor gene *p14^{ARF}* via a variant T-site in the initiator. *J Biol Chem*. 2002;277(29):26120-26127. doi 10.1074/jbc.M200403200
- Ortiz-Lombardia M., Foos N., Maurel-Zaffran C., Saurin A.J., Graba Y. Hox functional diversity: novel insights from flexible motif folding and plastic protein interaction. *BioEssays*. 2017;39(4):1600246. doi 10.1002/bies.201600246
- Pomerantz M.M., Qiu X., Zhu Y., Takeda D.Y., Pan W., Baca S.C., Gusev A., ... Lee G.-S.M., Corey E., Long H.W., Zwart W., Freedman M.L. Prostate cancer reactivates developmental epigenomic programs during metastatic progression. *Nat Genet*. 2020;52(8):790-799. doi 10.1038/s41588-020-0664-8
- Schuettengruber B., Bourbon H.-M., 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
- Siegel R.L., Miller K.D., Wagle N.S., Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023;73(1):17-48. doi 10.3322/caac.21763
- Tsherniak A., Vazquez F., Montgomery P.G., Weir B.A., Kryukov G., Cowley G.S., Gill S., ... Garraway L.A., Root D.E., Golub T.R., Boehm J.S., Hahn W.C. Defining a cancer dependency map. *Cell*. 2017;170(3):564-576.e16. doi 10.1016/j.cell.2017.06.010
- Vazquez F., Sellers W.R. Are CRISPR screens providing the next generation of therapeutic targets? *Cancer Res*. 2021;81(23):5806-5809. doi 10.1158/0008-5472.CAN-21-1784
- Vishnoi K., Viswakarma N., Rana A., Rana B. Transcription factors in cancer development and therapy. *Cancers (Basel)*. 2020;12(8):2296. doi 10.3390/cancers12082296
- Webber M.M., Quader S.T.A., Kleinman H.K., Bello-DeOcampo D., Storto P.D., Bice G., DeMendonca-Calaca W., Williams D.E. Human cell lines as an in vitro/in vivo model for prostate carcinogenesis and progression. *Prostate*. 2001;47(1):1-13. doi 10.1002/pros.1041
- Weiner A.B., Faisal F.A., Davicioni E., Karnes R.J., Griend D.J.V., Lotan T.L., Schaeffer E.M. Somatic HOXB13 expression correlates with metastatic progression in men with localized prostate cancer following radical prostatectomy. *Eur Urol Oncol*. 2021;4(6):955-962. doi 10.1016/j.euo.2020.05.001
- Xie X., Yu T., Li X., Zhang N., Foster L.J., Peng C., Huang W., He G. Recent advances in targeting the “undruggable” proteins: from drug discovery to clinical trials. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1):335. doi 10.1038/s41392-023-01589-z
- Yao J., Chen Y., Nguyen D.T., Thompson Z.J., Eroshkin A.M., Nerlakanti N., Patel A.K., ... Coppola D., Zhang J., Perera R., Kim Y., Mahajan K. The homeobox gene, *HOXB13*, regulates a mitotic protein-kinase interaction network in metastatic prostate cancers. *Sci Rep*. 2019;9(1):9715. doi 10.1038/s41598-019-46064-4
- Yarosh W., Barrientos T., Esmailpour T., Lin L., Carpenter P.M., Osann K., Anton-Culver H., Huang T. TBX3 is overexpressed in breast cancer and represses *p14^{ARF}* by interacting with histone deacetylases. *Cancer Res*. 2008;68(3):693-699. doi 10.1158/0008-5472.CAN-07-5012
- Yu M., Mazor T., Huang H., Huang H.-T., Kathrein K.L., Woo A.J., Chouinard C.R., ... Roeder R.G., Kim C.F., Zon L.I., Fraenkel E., Cantor A.B. Direct recruitment of polycomb repressive complex 1 to chromatin by core binding transcription factors. *Mol Cell*. 2012;45(3):330-343. doi 10.1016/j.molcel.2011.11.032
- Zabalza C.V., Adam M., Burdelski C., Wilczak W., Wittmer C., Kraft S., Krech T., ... Minner S., Simon R., Sauter G., Schlomm T., Tsourlakis M.C. HOXB13 overexpression is an independent predictor of early PSA recurrence in prostate cancer treated by radical prostatectomy. *Oncotarget*. 2015;6(14):12822-12834. doi 10.18632/oncotarget.3431
- Zhang J., Lee D., Dhiman V., Jiang P., Xu J., McGillivray P., Yang H., ... Cheng C., Yue F., Liu X.S., White K.P., Gerstein M. An integrative ENCODE resource for cancer genomics. *Nat Commun*. 2020;11(1):3696. doi 10.1038/s41467-020-14743-w
- Zhuang J.-J., Liu Q., Wu D.-L., Tie L. Current strategies and progress for targeting the “undruggable” transcription factors. *Acta Pharmacol Sin*. 2022;43(10):2474-2481. doi 10.1038/s41401-021-00852-9

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 07.02.2025. После доработки 08.04.2025. Принята к публикации 17.04.2025.