

Санкт-Петербургский Государственный университет
Биологический факультет
Кафедра биохимии

Юдичев Петр Андреевич

**Влияние экспрессии ядерного рецептора NR4A1 на метастазирование и
чувствительность к ДНК-повреждающим препаратам**

Выпускная квалификационная работа

Работа выполнена в лаборатории
Регуляции экспрессии генов ФГБУН
Института цитологии РАН
(зав. лаб. – д.б.н. Н.А. Барлев)

Научный руководитель:
доцент кафедры биохимии СПбГУ, к.б.н.,
Гришина Т.В.

Научный консультант:
н.с. лаб. Регуляции экспрессии генов
ФГБУН Институт цитологии РАН, к.б.н.,
Федорова О. А.

Санкт-Петербург
2019

Список сокращений	2
1. Введение	3
2. Обзор литературы	6
2.1 Структура и механизм действия рецепторов NR4A	8
2.2 Роль NR4A в процессах клеточной смерти, апоптоза и аутофагии	10
2.3 Роль NR4A иммунной системе, гемопоэтических процессах, воспалении и аутоиммунных заболеваниях.	11
2.4 Роль NR4A в нервной системе и нейрогенезе	12
2.5 Роль рецепторов NR4A в регуляции метаболизма	12
2.6 Роль представителей подгруппы NR4A в канцерогенезе	14
2.7 Резистентность к химиотерапевтическим препаратам раковых опухолей	16
3. Материалы и методы	20
3.1 Трансформация бактерий и выделение плазмидной ДНК	20
3.2 Получение псевдовиральных частиц и лентивирусная трансдукция	21
3.4 Фенол-хлороформное выделение РНК, проведение обратно-транскриптазной реакции для получения кДНК и анализ экспрессии генов ПЦР в реальном времени	23
3.5 Разделение белков в полиакриламидном геле и вестерн-блоттинг	25
3.6 Тетразолиевый тест (МТТ-тест)	28
3.7 Цитофлуориметрический анализ клеточного цикла с помощью PI метода окрашивания ДНК	28
4. Результаты	30
4.1 Подтверждение лентивирусной трансдукции и выполнения нокдауна <i>Nr4a1</i> клеточных MCF-7 и MDA-MB-231 линий вестерн-блоттингом	30
4.2 Изучение выживаемости клеточных линий с разным статусом экспрессии <i>Nr4a1</i> при обработке химиотерапевтическими препаратами с помощью МТТ-теста	32
4.3 Определение влияния ядерного рецептора NR4A1 на экспрессию генов, кодирующих про-апоптотические белки <i>Bax</i> , <i>Bad</i> и <i>Puma</i> после обработки доксорубицином	36
4.4 Определение влияния NR4A1 на уровень белков-регуляторов клеточного цикла при обработке химиотерапевтическими препаратами	38
4.5 Изучение влияния NR4A1 на экспрессию генов-маркеров эпителиального и мезенхимального фенотипов с помощью ПЦР в реальном времени	40
4.6 Изучение влияния экспрессии <i>Nr4a1</i> на клеточный цикл методом проточной цитометрии с окрашиванием ДНК пропидием йодидом	43
5. Обсуждение	45
6. Выводы	48
Список литературы	49

Список сокращений

ПЦР в РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ПААГ – полиакриламидный гель

ПСА – персульфат аммония

ПЦР в РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

PBS – Phosphate buffered saline (0,01 М натрий-фосфатный буфер с 0,15 М NaCl pH 7,4)

PMSF – Phenylmethylsulfonyl fluoride

SDS – Sodium dodecyl sulfate – додецилсульфат натрия

shRNA – short hairpin RNA (малая шпилечная РНК)

ТЕМЕД – тетраметилэтилендиамин

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

LB – Liquid Broth

МТТ – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид)

TGB – Tris-glycine buffer (трис-глициновый буфер)

RIPA – Radioimmunoprecipitation assay buffer

FXR – Farnesoid X receptor

RXR – Retinoid X receptor

PPARs – Peroxisome proliferator-activated receptors

LXR – Liver X receptor прегнан-Х-рецептор

PXR – Pregnane X receptor

1. Введение

Ядерные рецепторы представляют собой суперсемейство белков, которые регулируют ключевые клеточные процессы. В их число входит большая группа транскрипционных факторов, называемая орфанными ядерными рецепторами, которые в ходе эволюции потеряли способность связывать лиганд и выполнять рецепторную функцию.

Экспрессия генов, кодирующих орфанные ядерные рецепторы, индуцируется в ответ на широкий спектр стимулов. Орфанные ядерные NR4A играют важную роль в регуляции энергетического метаболизма, дифференцировки, пролиферации и роста клеток, нейрогенезе, иммуногенезе, а также участвуют в патогенезе большого количества заболеваний.

Подсемейство ядерных рецепторов NR4A, или NGF-IB-подобных белков, имеет в своем составе 3 представителей: NR4A1, NR4A2, NR4A3. Лиганд-независимая регуляция экспрессии генов, осуществляемая этими белками, имеет сложную природу и зависит от большого количества факторов, включая: белок-белковые взаимодействия, пост-трансляционные модификации, в зависимости от клеточного контекста и локализации. Помимо этого, для NR4A1-3 показано наличие нескольких изоформ.

Злокачественная трансформация клеток происходит при нарушении экспрессии генов, регулирующих клеточную смерть, систему репарации ДНК, пролиферацию и рост, взаимодействие с иммунной системой и другими клетками микроокружения. Опухоли разных типов обладают уникальным профилем нарушений экспрессии генов, накапливаемых в ходе патогенеза (Hanahan, Weinberg, 2011).

Участие NR4A1 в онкогенезе прежде всего связано с функциями данного транскрипционного фактора. Нарушения в регулируемых NR4A1 клеточных процессах могут приводить к злокачественной трансформации клеток. Изменения экспрессии *Nr4a1* обладают опухоле-специфическим характером, так как функциональная активность ядерного рецептора NR4A1 зависит от клеточного и тканевого контекста. Кроме того, для представителей подсемейства NR4A характерна функциональная избыточность, то есть способность дублировать функции друг друга, что делает сложным исследование индивидуальной роли рецепторов как при нормальных физиологических условиях, так и в ходе патологических процессах.

В последние двадцать лет в противоопухолевой терапии произошел существенный прогресс и было зарегистрировано рекордное количество препаратов нового поколения: селективных лекарств, иммунотерапии, генетической и вирусной терапии. Однако, несмотря на различные ограничения использования препаратов, а также многочисленных побочных эффектов для пациентов, химиотерапия остается эффективным и применяемым терапевтическим подходом. Более того, химиотерапия активно используется в сочетании с лучевой, хирургической, селективной и иммунотерапией. Химиотерапевтические препараты согласно механизму действия можно отнести к ДНК-повреждающим агентам, антиметаболитам, ингибиторам полимеризации микротрубочек и микрофиламентов.

Существенным недостатком химиотерапии является возникновение множественной лекарственной устойчивости. Популяция клеток опухоли из-за высокой частоты мутаций обладает огромной гетерогенностью. В связи с этим связано возникновение широкого спектра механизмов резистентности, включающих: мутацию в белке-мишени, удаление лекарства из клетки, устойчивость к апоптозу, индукция систем репарации ДНК. Несмотря на существенный прогресс в понимании механизмов развития устойчивости к химиопрепаратам, на данный момент развитие резистентности к препаратам является актуальной проблемой для современной медицины.

Белки подсемейства NR4A, являясь важными регуляторами ключевых клеточных процессов, могут участвовать в возникновении устойчивости к химиотерапии. Для NR4A1, как наиболее изученного белка семейства NR4A, на данный момент известны агонисты и антагонисты, что делает NR4A1 наиболее актуальной потенциальной мишенью для фармакологической терапии. Более подробное исследование орфанного ядерного рецептора NR4A1 представляет большой интерес как из-за широкого набора его функций, так и сложной системы белок-белковых взаимодействий.

Целью данного исследования является изучение влияния экспрессии гена, кодирующего ядерный орфанный рецептор NR4A1, на устойчивость к ДНК-повреждающим химиотерапевтическим препаратам, а также на метастатический потенциал клеток.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Осуществить нокдаун гена *Nr4a1* в клеточных линиях MCF-7 и MDA-MB-231 и изучить их выживаемость при обработке ДНК-повреждающими препаратами (доксорубицином, цисплатином или этопозидом).
2. Сравнить уровень экспрессии генов *Puma*, *Bax*, *Bad*, регулирующих апоптоз, в клеточных линиях рака молочной железы с разным статусом экспрессии гена *Nr4a1* при обработке ДНК-повреждающими препаратами.
3. Определить влияние NR4A1 на экспрессию генов-маркеров эпителиально-мезенхимального перехода – *VIM* и *SNAIL*.
4. Изучить влияние экспрессии *Nr4a1* на распределение фаз клеточного цикла в популяции клеток линии MCF-7 при воздействии ДНК-повреждающим препаратом этопозидом.

2. Обзор литературы

Связанные со злокачественными новообразованиями заболевания относятся к одной из основных причин заболеваемости и смертности в мире. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения в 2018 году было выявлено свыше 18 млн новых случаев онкологических заболеваний, смертность составила почти 10 млн человек (<https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf>).

На сегодняшний день фундаментальные и клинические исследования рака остаются актуальной и стремительно развивающейся областью для большей части научного и медицинского сообщества, а также фармацевтической индустрии. Основным препятствием для исследования онкологических заболеваний и разработки эффективных терапевтических протоколов является уникальность прохождения канцерогенеза разных типов рака. Злокачественная трансформация клеток различных тканей зависит от большого количества генетических, эпигенетических, а также других факторов (Weinberg, 2014).

Высокий уровень мутаций генома и нестабильность эпигенома раковых клеток является причиной возникновения множественной лекарственной устойчивости, уклонения от иммунного ответа, устойчивости к апоптозу и приобретения инвазивности клетками опухоли (Negrini et al., 2010).

При злокачественной трансформации клеток наблюдается накопление изменений в генетической и эпигенетической информации, что приводит к нарушению регуляции экспрессии генов, микроэволюции опухоли и проявлению у клеток совокупности фенотипических признаков, присущих раковым клеткам (Hanahan, Weinberg, 2011). Регуляция экспрессии генов – многоступенчатый процесс, осуществляемый на этапах транскрипции, процессинга и деградации мРНК, трансляции и посттрансляционной модификации белков (Perdew et al., 2008).

Ядерные рецепторы – большое суперсемейство белков-транскрипционных факторов с консервативным доменным строением. Впервые ядерные рецепторы выделяются в отдельную группу в ранней эволюционной истории таксона Metazoa. Дупликация и диверсификация ядерных рецепторов коррелирует со структурным усложнением животных в ходе эволюции (McEwan, 2015).

Активация ядерных рецепторов происходит при взаимодействии с тироидными, стероидными и пептидными гормонами, факторами роста, жирными кислотами и их производными, физические воздействия и нейротрансмиттерами. При взаимодействии с лигандом ядерные рецепторы принимают биологически активную форму гомо- или гетеродимера, способную связываться с ДНК и регулировать транскрипцию генов. Орфанные рецепторы не связываются с лигандом и находятся в конститутивно активированном состоянии (McEvan, 2009; Sever et al., 2013).

Суперсемейство ядерных рецепторов принято разделять на 3 группы в зависимости от существования эндогенного лиганда. К первой группе относятся рецепторы, которые были преимущественно обнаружены в ходе клонирования и скрининга кДНК библиотек, а затем были открыты соответствующие эндогенные лиганды. В эту группу входят рецепторы, связывающиеся и активирующиеся различными метаболитами: фарнезиноидный-X-рецептор (FXR), ретиноидный рецептор X (RXR), рецепторы активируемые пероксисомным пролифератором (PPARs), печеночный X рецептор (LXR), прегнан-X-рецептор (PXR) и другие (Safe et al., 2014).

Вторая группа включает так называемые орфанные (от англ. *orphan*), или сиротские, ядерные рецепторы, чьи эндогенные лиганды не были идентифицированы. Последнюю группу составляют экс-орфанные, или так называемые приемные (англ. *adopted*), для которых изначально не был известен эндогенный лиганд, однако в ходе дальнейших исследований он был определен.

Подобно другим представителям суперсемейства ядерных рецепторов, орфанные ядерные рецепторы выполняют важную функциональную роль в процессах роста, пролиферации, регуляции клеточного цикла, дифференцировке клеток, иммунитете, эмбриогенезе, органогенезе, апоптозе, энергетическом метаболизме. Также для них показано участие в патогенезе множества заболеваний (Maxwell, 2006).

Семейство орфанных ядерных рецепторов включает NR0B2, NR2C1, NR2C2, NR2E, NR2E3, NR2F1 (COUP-TFI), NR1D1/2 (Rev-Erb $\alpha\beta$), NR2F2, NR2F6, NR4A1 (NGFIB/Nur77), NR4A2 (Nurr1), NR4A3 (Nor1) и NR6A1 (GCNF) (Safe et al., 2016; Mullican et al., 2013).

Орфанные ядерные рецепторы разделяют на 5 подсемейств в зависимости от гомологии последовательности: ретиноид X рецептор-подобное (RXR) подсемейство,

эстроген рецептор-подобное подсемейство, NGF-IB-подобное подсемейство (группа NR4A), тиреоидный рецептор-подобное подсемейств и подсемейство белков подобных рецептору к стероидогенному фактору (McEwan, 2015).

2.1 Структура и механизм действия рецепторов NR4A

Впервые белки подсемейства NR4A были описаны как продукты генов раннего ответа три десятилетия назад в ходе исследований дифференцировки нейронов, поэтому исходное наименование NR4A1, NGF-IB (Neuron Growth Factor IB), указывает на роль белка в развитии нервной системы (Mullican et al., 2013).

Члены подсемейства NR4A имеют высокую степень гомологии между собой в ДНК-связывающем домене (~90-95 %) и лиганд-связывающем карбокси-терминальном домене (~60 %), а также консервативную экзон/интронную организацию. Этот факт является основанием для гипотезы о происхождении генов, которые кодируют рецепторы, от единого предшественника в результате дупликации (Saucedo-Cardenas et al., 1997; Ohkura, 1996). Однако аминокислотные домены NR4A сильно отличаются внутри семейства.

Ядерные рецепторы подсемейства NR4A имеют типичное для ядерных рецепторов строение и состоят из N-терминального домена, ДНК-связывающего домена (DNA-binding domain, DBD), шарнира и лиганд-связывающего домена (Ligand Binding Domain, LBD). ДНК-связывающий домен включает в себя структуру двух “цинковых пальцев”, содержащих по 4 аминокислотных остатка цистеина, координирующих ионы цинка. На лиганд-связывающем домене располагается участок димеризации, отвечающий за образование гомодимеров или гетеродимеров с другими ядерными рецепторами. Данный участок обеспечивает как широкий спектр взаимодействий, так и выполняемых регуляторных функций (Kurakula et al., 2014). ДНК-связывающий и карбокси-терминальный домен представителей подсемейства NR4A, как и у большинства ядерных рецепторов состоит из 11-12 α -спиралей. На карбокси-конце рецепторов располагается AF-2 домен. Аминокислотный лиганд-связывающий домен содержит активационный домен AF-1 (activation factor-1), который способен осуществлять лиганд-независимую регуляцию транскрипции (Wansa et al., 2002), что обеспечивает трансактивацию рецептора, а также участвует во взаимодействии с коактиваторами.

Рецепторы NR4A обладают уникальной для ядерных рецепторов структурой лиганд-связывающего домена. Для этого подсемейства характерно отсутствие канонического лиганд-связывающего “кармана”, так как он образован остатками гидрофобных аминокислот. С помощью рентгеноструктурного анализа было показано, что лиганд-связывающий домен рецептора NR4A1 (Nur77) находится в активной конформации, что обуславливает способность рецепторов к конститутивной лиганд-независимой активации транскрипции. Другой особенностью является отсутствие классического региона связывания с коактиваторами, образуемыми спиралями 3, 4 и 12 лиганд-связывающего домена. Однако гидрофобная область, находящаяся между спиралями 11 и 12, представляет уникальную для подсемейства область связывания кофакторов (Maxwell, 2006).

Все представители NR4A способны связываться в форме мономера с NGFIB-элементом (NBRE; AAAGGTCA) промотерных областей генов, однако афинность к каждому конкретному элементу среди членов подсемейства различается. Для гомо- и гетеродимеров NR4A показано, что они взаимодействуют с Nur-акцепторными элементами (NurREs; TGATATTTn6AAATGCCA). NR4A1 и NR4A2 способны образовывать гетеродимеры с альфа и гамма изоформами рецептора ретиноидов X и связываться с последовательностью DR5 (Direct Repeat 5 sequence, AGGTCAx(xxxx)AGGTCA) используя одновременно лиганд-связывающие домены RXR и NR4A (Kurakula et al., 2014).

NurRE частично перекрывается с STAT1-3 элементом, NR4A1 и STAT1-3 способны кооперативно связываться, с так называемым, NurRE-STAT сайтом, однако прямого взаимодействия между белками не происходит, поэтому предполагается, что в процессе участвует один или несколько белков-адаптеров (Maxwell, Muscat, 2005).

Детерминантами транскрипционной активности и генов-мишеней представителей подсемейства NR4A является внутриклеточная локализация, посттрансляционные модификации, уровень экспрессии кодирующих генов и их эпигеномная конфигурация, белок-белковые взаимодействия с коактиваторами и корепрессорами (Kurakula et al., 2014).

Как и другие ядерные рецепторы, NR4A1 служит мишенью многих пост-трансляционных модификаций. Уровень экспрессии генов NR4A модулируется cAMP-опосредованной активацией протеинкиназы A (PKA) и MAPK-киназного пути (Hawk,

Abel, 2011). Фосфорилирование NR4A1 ERK2 увеличивает стабильность белка и способность к трансактивации, что способствует митогенному эффекту NR4A1. Известно, что протеинкиназа C и ERK необходимы для модуляции экспрессии *Nr4a1* в дофаминергических нейронах при применении антипсихотиков (Bourhis et al., 2008).

Рецепторы NR4A пост-трансляционно модифицируются белками, входящими в сигнальный путь PI3K-AKT-mTOR, который выполняет важную функцию в регуляции метаболизма и пролиферации клеток. Показано, что PI3K фосфорилирует NR4A1 по остатку Ser351, что приводит к снижению NR4A1-опосредованного апоптоза (Beard et al., 2015).

2.2 Роль NR4A в процессах клеточной смерти, апоптоза и аутофагии

Часть апоптотических функций NR4A1 не зависит от транскрипционной активности белка: ядерный экспорт и перемещение NR4A1 к митохондрию вызывает выброс цитохрома c в цитоплазму (Li et al., 2000). Более поздние исследования выявили механизм про-апоптотического действия, показав, что NR4A1 при транслокации из ядра к митохондрию способен связываться с анти-апоптотическим белком Bcl-2, способствуя его про-апоптотической конверсии. Считается, что при таком взаимодействии про-апоптотический ВНЗ-домен Bcl-2 выставляется наружу из мембраны митохондрии и способствует инициации клеточной смерти (Lin et al., 2004).

Апоптотическая функция NR4A1 имеет важное значение для положительной селекции тимоцитов в ходе образования иммунокомпетентных клеток, так как NR4A1 необходим для апоптоза, запускаемого T-клеточным рецептором (Costello et al., 2004). Показано, что этот процесс запускается транслокацией NR4A1 из ядра и взаимодействием с Bcl-2 (Thompson, Winoto, 2008).

Показано, что активация филогенетически неродственных рецепторов NK1R (G-белок связанный рецептор) и IGF1R (рецептор-тирозинкиназа) приводит к индукции экспрессии *Nr4a1* и последующей аутофагической клеточной смерти, опосредованной транскрипционной активностью NR4A1. ДНК-связывающая активность NR4A1 способна активировать транскрипцию про-апоптотических генов, таких как *Puma*, *Bax*, *Bad* и *Puma* (Bouzas-Rodríguez et al., 2012). Антагонист NR4A1 THPN (1-(2,4,6-тригидроксифенил)-1-нонанон) при взаимодействии с NR4A1 вызывает аутофагическую смерть в клетках меланомы (Pawlak et al., 2015).

Существуют данные об участии NR4A1 в апоптозе клеток, наблюдаемом при субарахноидальном кровоизлиянии. Предполагается, что фосфорилирование c-Jun N-терминальной киназой имеет важное значение для осуществления про-апоптотической функции NR4A1 (Dai et al., 2014).

2.3 Роль NR4A в иммунной системе, гемопоэтических процессах, воспалении и аутоиммунных заболеваниях.

Наиболее исследованным является участие NR4A в процессах активации, развития Т-лимфоцитов и сигнальных путях Т-клеточного рецептора, включая ТКР-опосредованный апоптоз. Была показана роль NR4A1 в негативной селекции $CD4^+ CD8^+$ незрелых тимоцитов, которые обладают высокой реактивностью к собственным антигенам вследствие высокой аффинности (Cainan et al., 1995). Клональная делеция является основным механизмом, обуславливающим толерантность иммунных клеток к аутоантигенам, на пути дифференцировки в иммунокомпетентные клетки.

Мыши с нокаутом по гену *Nr4a1* развиваются без заметных нарушений и способны вырабатывать нормальные Т-лимфоциты по сравнению с животными дикого типа, что указывает на высокую степень функциональной избыточности представителей NR4A. Экспрессия Nr4a необходима для развития популяции регуляторных Т-лимфоцитов, модулирующих иммунный ответ и толерантность к собственным антигенам. Тройной нокаут Nr4a у грызунов приводит к отсутствию Т-регуляторных клеток и развитию аутоиммунных заболеваний различных органов (Sekiya et al., 2013).

Активация Т-клеточного рецептора индуцирует высокий уровень экспрессии NR4A2 и NR4A1 и является важным его регулятором. Показано, что активированная Акт-киназа способна осуществлять фосфорилирование NR4A1 по остатку Ser350, ингибирующую ДНК-связывающую и транскрипционную активность рецептора, тем самым препятствуя ТКР-зависимому апоптозу (Masuyama et al., 2001).

На основании данных об индукции экспрессии *Nr4a1-3* под действием ряда провоспалительных цитокинов возможно предположить, что эти рецепторы выполняют функцию медиатора воспалительных сигналов (Castrillo et al., 2005). Данные экспериментов как *in vivo*, так и *in vitro* указывают на тесную взаимосвязь сигнального пути NF-κB и рецепторов NR4A.

Хроническое воспаление является ключевой особенностью ряда аутоиммунных заболеваний, включающих атеросклероз, псориаз, ревматоидный артрит, а также одной из ключевых черт раковых опухолей. Высокий уровень экспрессии *Nr4a1-3* обнаружен в тканях, находящихся в состоянии хронического воспаления, которое является отличительным признаком аутоиммунных процессов.

В ходе экспериментов на $NR4A1^{-/-}$ мышах показано критическое значение рецептора для дифференцировки $Ly6C^{low}$ моноцитов, выполняющих противовоспалительную функцию. Животные, нокаутированные по *Nr4a1*, более подвержены аутоиммунным заболеваниям (Hanna et al., 2011).

Нокаут гена *Nr4a1* в гемопоэтических клетках мышей приводит к усилению воспалительного ответа за счет дифференцировки макрофагов в провоспалительный фенотип и вызывает активную секрецию провоспалительных иммунномедиаторов $IFN\gamma$, IL-12, NO-синтазы (Hanna et al., 2012; Koenis et al., 2018). Также недостаток NR4A1 способствует ослаблению процессов репарации тканей и резолюции воспаления (Murphy, 2015).

2.4 Роль NR4A в нервной системе и нейрогенезе

Представители подсемейства NR4A были впервые описаны как факторы нейрогенеза дофаминовой системы среднего мозга, контролирующей экспрессию генов ключевых ферментов биосинтеза моноаминов, тирозингидроксилазы и декарбоксилазы ароматических аминокислот (Castillo et al., 1998; Gilbert et al., 2008). Позднее была установлена экспрессия и функциональная роль *Nr4a1* в других отделах мозга.

NR4A1 способен регулировать экспрессию генов, кодирующих нейротрофические факторы, а также участвует в NF- κ B-зависимой активации транскрипции, что позволяет выдвинуть предположение об участии NR4A1 в формировании памяти и обучении (Hawk, Abel, 2013).

2.5 Роль рецепторов NR4A в регуляции метаболизма

Орфаные ядерные рецепторы играют важную роль в регуляции энергетического метаболизма. В тканях с высокой утилизацией энергии обнаружена высокая экспрессия

генов, кодирующих ядерные орфаные рецепторы, что указывает на их значимость для метаболических процессов. Белки NR4A способны активировать транскрипцию генов как липидного, так и углеводного метаболизма (Pearen, Muscat, 2010; Ranhotra, 2014).

К наиболее распространенным метаболическим заболеваниям относятся ожирение, резистентность к инсулину и сахарный диабет второго типа. Показано, что уровень экспрессии NR4A различается в животных моделях инсулинорезистентности, ожирения и диабета и имеет тканеспецифический характер. У пациентов, больных ожирением, обнаружен большой уровень мРНК генов *Nr4a1-3* в подкожной жировой ткани в сравнении с контрольной группой без лишнего веса. В этом же исследовании у людей с лишним весом отмечена увеличенная экспрессия NR4A в висцеральном жире в сравнении с подкожным. (Veum et al., 2012) Существует вероятность, что большая концентрация циркулирующих жирных кислот, один из маркеров инсулинорезистентности и ожирения, может вызывать повышение экспрессии NR4A в клетках. Действительно, длинноцепочечные насыщенные жирные кислоты способны индуцировать экспрессию рецепторов подсемейства NR4A в некоторых моделях заболеваний. На MIN6 бета-клеточной линии продемонстрирована ядерная транслокация NR4A, вызываемая пальмитиновой кислотой. Нокдаун *Nr4a1* у мышей существенно снижал утилизацию энергии на диете с высоким содержанием жира (Chao et al., 2009). На основании вышеперечисленных данных можно предположить, что представители подгруппы NR4A выступают медиаторами энергетического метаболизма и пищевого поведения (Close et al., 2013).

Исследования установили, что сверхэкспрессия NR4A в скелетных мышцах грызунов стимулирует экспрессию генов метаболизма глюкозы, кодирующих белки-переносчики глюкозы и ферменты гликолиза. В нескольких исследованиях на мышах и клеточных линиях было показано снижение уровня экспрессии гликолитических и липолитических ферментов, переносчика Glut4 при РНК-интерференции NR4A (Maxwell, 2005; Chao et al., 2007). Мышцы животных, дефектных по гену *Nr4a1*, демонстрируют повышенную резистентность к инсулину и толерантность к глюкозе. Образцы скелетных мышц трансгенных мышей с оверэкспрессией *Nr4a1* содержат увеличенное количество митохондрий с высоким уровнем комплексов I и IV электрон-транспортной цепи, что соответствует активному окислительному метаболизму. Во многих исследованиях, использовавших РНК-интерференцию для снижения экспрессии *Nr4a1*, наблюдалось компенсаторное увеличение экспрессии *Nr4a3* на основе чего можно предположить

наличие функциональной избыточности у представителей подсемейства ядерных рецепторов NR4A при регуляции метаболизма.

На гепатоцитах мыши как *in vitro*, так и *in vivo* было продемонстрировано, что NR4A1 стимулирует экспрессию ферментов глюконеогенеза. Экспрессия генов *Nr4a* в клетках печени индуцируется глюкагоном и в условиях голодания. Повышение синтеза глюкозы печенью считается одним из ключевых признаков диабета, таким образом, на основании существующих данных можно предположить, что NR4A вовлечены в патогенез диабета. (Close et al., 2013; Pearen, 2010).

Кроме регуляции метаболизма углеводов, представители NR4A также влияют на метаболизм жирных кислот. Индукция экспрессии NR4A1-3 под действием агонистов β -адренергических рецепторов в адипоцитах и скелетных мышцах описана в нескольких литературных источниках (Pearen et al., 2006; Myers et al., 2009). Известно, что адренергический сигналинг способствует активации β -окисления в данных тканях и временно активирует экспрессию NR4A. Продемонстрирована способность NR4A1 снижать содержание триглицеридов и стерола в тканях печени (Pols et al., 2008).

2.6 Роль представителей подгруппы NR4A в канцерогенезе

Транскрипционные факторы NR4A регулируют процессы апоптоза, репарации ДНК, метаболизма, ангиогенеза и пролиферации, нарушения регуляции этих клеточных процессов являются ключевыми особенностями онкогенеза, что обуславливает вовлечение представителей подсемейства в развитие злокачественных новообразований.

Взаимодействие NR4A с транскрипционными мишенями имеет сложную многофакторную природу и сильно зависит от клеточного контекста, кроме того представители подсемейства функционально избыточны относительно друг друга (Mohan et al., 2012), данные особенности делают затруднительным определение однозначной функции рецепторов NR4A в ходе канцерогенеза.

Нарушение экспрессии *Nr4a1* относительно нормального уровня в здоровых тканях наблюдается в различных раковых новообразованиях и их молекулярных подтипах, включая: рак легкого, рак простаты, рак молочной железы. Сложное строение интерактома, тканеспецифические функции и богатый набор регулируемых процессов

обуславливают то, что изменение уровня NR4A1 происходит по-разному в различных молекулярных подтипах рака.

С другой стороны, NR4A1 может выполнять функцию онкосупрессора, так как транслокация NR4A1 из ядра в цитозоль и взаимодействие с анти-апоптотическим белком bcl-2 вызывает смену его функции на про-апоптотическую. Для NR4A1 показана способность активировать транскрипцию генов, кодирующих про-апоптотические белки, например: Puma, Bax, Bad, Bak (Bouzas-Rodríguez et al., 2012).

В эстроген-положительных и эстроген-отрицательных опухолях рака молочной железы показана повышенная экспрессия *Nr4a1*. (Hendrick et al., 2015; Moll et al., 2006). Однако было показано, что в тройном негативном раке молочной железы наблюдается низкий уровень экспрессии *Nr4a1*, так как в данном подтипе рака он выполняет функцию онкосупрессора (Wu et al., 2017).

Важнейший онкосупрессор человека p53 является центральным звеном регуляторной системы, определяющей судьбу клетки. В ответ на повреждение ДНК и другие стрессорные факторы уровень белка p53 возрастает, так как происходит ингибирование его протеолиза. Индукция p53 вызывает остановку клеточного цикла, что позволяет системе репарации ДНК исправить ошибки. Способность p53 связываться с ДНК и активировать транскрипцию про-апоптотических генов при сильных повреждениях генома тесно связана с онкосупрессорной функцией p53. Известно, что более 50% раковых опухолей человека содержат мутации в гене, кодирующем p53. (Ozaki, Nakagawara, 2011; Olivier et al., 2010).

NR4A1 может взаимодействовать с p53 и регулировать p53-опосредованный сигналинг, активируя транскрипцию генов-эффекторов. Показано, что NR4A1 способен опосредованно вызывать деградацию MDM2, стабилизируя HIF-1 α и повышая резистентность опухоли к гипоксии. NR4A1 стабилизирует p53, ингибируя MDM2-зависимое убиквитинилирование и протеолиз. Также исследования показали, что связывание NR4A1 с p53 блокирует его ацетилирование и, как следствие, опосредованную p53 трансактивацию (Beard et al., 2014).

Рост раковых опухолей критически зависит от прорастания новых кровеносных сосудов в опухоль для компенсации недостатка кислорода. Экспрессия *Nr4a1* запускается

при активации рецептора VEGF, таким образом, транскрипционная активность NR4A1 важна для VEGF-зависимого ангиогенеза (Zheng et al., 2006).

Показано, что NR4A1 способен выступать в роли онкогена, способствуя росту и выживаемости клеток (Deutsch et al., 2012). NR4A1 влияет на метастатический потенциал клеток. Эпителиально-мезенхимальный переход служит основой приобретения клетками способности к метастазированию. В первую очередь этот процесс запускается взаимодействием цитокина TGF- β с его клеточным рецептором. Эксперименты *in vitro* показали, что NR4A1 способствует активации TGF- β -SMAD сигнального пути, так как является фактором протеолиза ингибиторной молекулы SMAD7 (Zhou et al., 2014).

Устойчивость к химиотерапии и высокий уровень мутаций у раковых клеток может быть обусловлен нарушением работы репарации ДНК. Показано, что NR4A1 взаимодействует с системой репарации двунитевых разрывов ДНК. Известно, что функция NR4A1 в репарационном комплексе не связана с его транскрипционной функцией. Для транслокации NR4A1 к сайту репарации ДНК необходимо фосфорилирование белка ДНК-протеинкиназой (Malewicz et al., 2011).

2.7 Резистентность к химиотерапевтическим препаратам раковых опухолей

Современное понимание канцерогенеза значительно продвинулось благодаря многочисленным данным, полученным в области фундаментальной и клинической онкологии. К характерным чертам рака относятся: абнормальный и неконтролируемый рост, избегание иммунного ответа, повышение уровня генетической нестабильности, возникновение хронического воспаления, приобретение подвижности и инвазивности при метастазах (Hanahan, Weinberg, 2011).

Накопленные знания легли в основу создания современных противоопухолевых протоколов. Так обнаружение мутаций необходимых для выживания определенных типов злокачественных новообразований привело к разработке селективных препаратов. Активно развивается направление иммунотерапии рака, включающее такие перспективные методы, как ингибирование иммунных контрольных клеток и создание Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR-T) (Marshall, Djamgoz, 2018). Несмотря на создание новых терапевтических методик, химиотерапия остается наиболее

применяемым подходом к терапии злокачественных новообразований. Более того, многие современные и традиционные противоопухолевые протоколы включают адъювантную или неадъювантную химиотерапию.

Существующие химиотерапевтические агенты являются ДНК-повреждающими препаратами, антиметаболитами, ингибиторами образования микротрубочек. Механизмы устойчивости зависят, как от препарата и его молекулярной мишени, так и от типа злокачественного новообразования. Резистентность к ДНК-повреждающим агентам может выработаться благодаря повышению устойчивости к апоптозу, индукции системы репарации ДНК, изменению метаболизма ксенобиотиков, повышению уровня белков-переносчиков, мутациям в белках-мишенях и запуску эпителиально-мезенхимального перехода (схема представлена на *рис. 1*) (Gottesman, 2002; Gillet, Gottesman, 2009).

ДНК-повреждающие препараты способны напрямую (основанные на платине алкилирующие агенты, индуцируют формирование сшивок в ДНК) или опосредованно вызывать повреждения ДНК (ингибиторы топоизомераз I и II). Доксорубицин и родственные препараты антрациклинового класса (эпирубицин, даунорубицин) являются интеркалирующими агентами, ингибиторами топоизомеразы II. Доксорубицин в больших концентрациях обладает дополнительным механизмом действия: он вызывает образования активных форм кислорода, которые повреждают ДНК и окисляют липиды. Их воздействие останавливает репликацию и вызывает двунитевые разрывы ДНК. Ошибки в ДНК запускают остановку клеточного цикла в G1/S или G2/M контрольной точке, что ингибирует пролиферацию раковых клеток (Patel, Kaufmann, 2012). На резистентность химиотерапии в случае воздействия ДНК-повреждающих препаратов влияет способность клеток к репарации ошибок ДНК, что позволяет восстановить повреждения и запустить клеточный цикл. В некоторых раковых опухолях система регуляции клеточного цикла нарушена из-за повышения экспрессии онкогенов или понижения экспрессии онкосупрессоров. Такие раковые клетки обладают повышенной устойчивостью к химиотерапии (Ehrhardt et al., 2013; Shapiro, Harper, 1999).



Рис 1. Механизмы возникновения множественной лекарственной устойчивости у раковых клеток.

Эпителиально-мезенхимальный переход вызывает смещение фенотипа клеток от эпителиального к мезенхимальному, связанному с потерей поляризации и межклеточных контактов, смене промежуточных филаментов и приобретением способности к инвазии и метастазированию (Weinberg, 2014). Более того, ряд исследований связывает приобретение мезенхимальных черт с повышенной устойчивостью к химиотерапии (Mitra et al., 2015; Chaffer et al., 2016). Было показано, что мезенхимальные признаки в клеточных линиях положительно коррелируют с их выживаемостью при обработке химиотерапевтическими препаратами (Deutsch et al., 2012).

Механизмы множественной лекарственной устойчивости и восприимчивость к химиотерапевтическим препаратам определенного класса уникальны для опухолей разных подтипов. Это прежде всего связано с особенностями протекания злокачественной трансформации и накапливающимися изменениями в экспрессии генов (Housman et al., 2014). Влияние экспрессии *Nr4a1* на устойчивость к химиотерапии в различных молекулярных подтипах рака является малоизученной областью. NR4A1 регулирует репарацию ДНК, апоптоз и клеточный цикл, что делает актуальным изучение вклада орфанных ядерных рецепторов в резистентность к химиотерапии. Поскольку для NR4A1

описаны агонисты и антагонисты, он является потенциальной мишенью для противораковой терапии.

3. Материалы и методы

3.1 Трансформация бактерий и выделение плазмидной ДНК

Для выполнения РНК-интерференции применяли вирусную трансдукцию клеточных линий с использованием плазмиды pLKO.1, кодирующая миРНК (shRNA) к мРНК гена *Nr4a1*. Карта плазмиды представлена на рис. 2. В качестве контроля использовали трансдукцию клеток вектором, не кодирующим функциональный РНК-интерферирующий транскрипт (неспецифическая “scramble”-плаزمида).

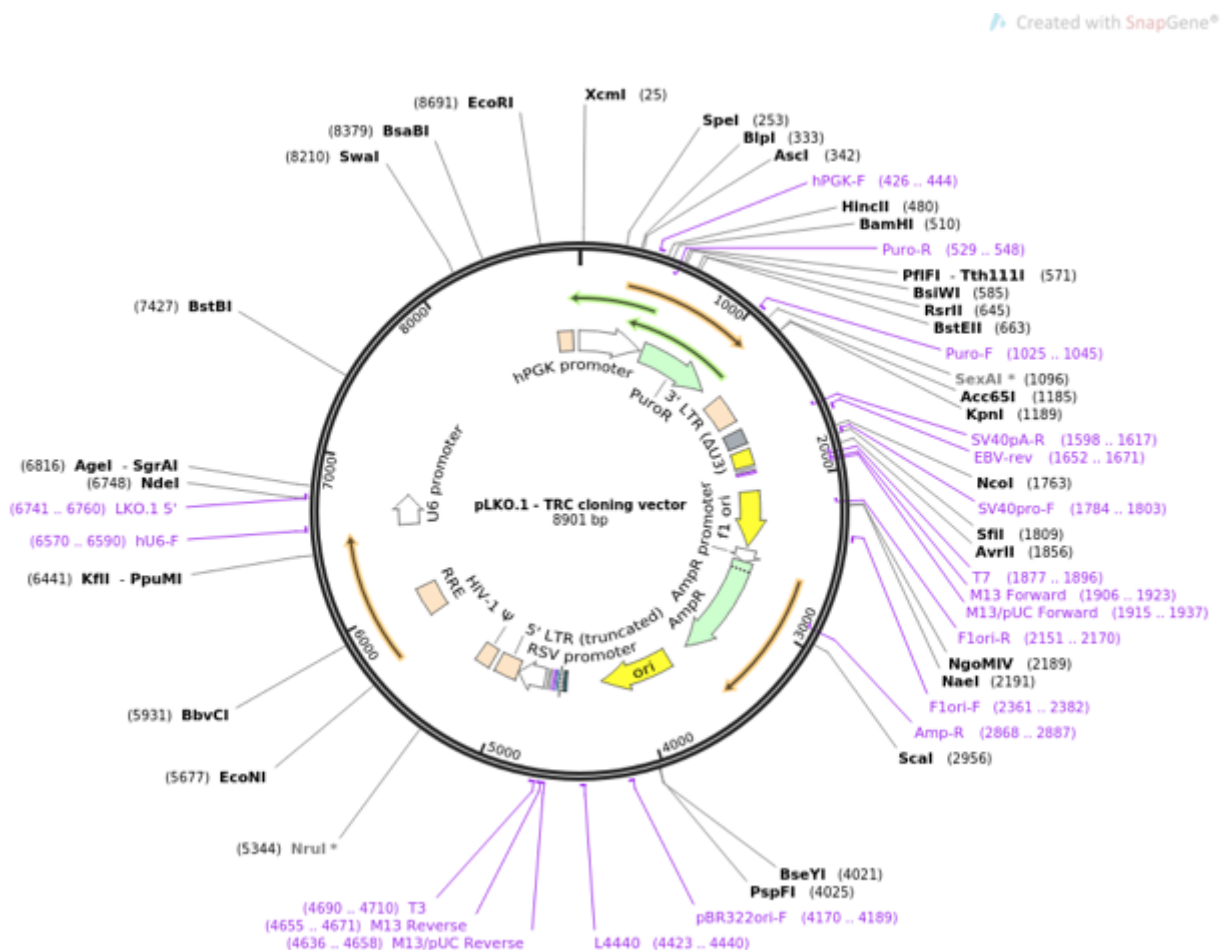


Рис 2. Карта плазмиды, использованной для трансдукции <https://www.addgene.org/10878/>

Для наработки необходимого для трансдукции количества плазмидной ДНК проводили трансформацию компетентного штамма *E. Coli* Stb13 методом теплового шока.

К предварительно размороженной на льду бактериальной суспензии добавляли по 100 нг плазмидной ДНК, инкубировали 20 мин на льду, затем 1 мин при 42°C с последующей инкубацией на льду в течение 20 мин. Полученную бактериальную суспензию далее втирали в чашки Петри со средой LB с агаром и антибиотиком канамицином в концентрации 50 мкг/мл. Чашки инкубировали в течение ночи при 37°C.

Взятую из ночную культуру единичную колонию на следующий день пересевали на 300 мл жидкой среды LB и инкубировали в течение 20 часов при 37°C.

Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора Евроген Midiprep 2.0 (Евроген, Россия). В его состав входят: спин-колонка Midi, РНКаза А, ресуспендирующий раствор, лизирующий раствор, нейтрализующий раствор, промывочный раствор, элюирующий раствор (5 mM Tris-HCl pH 7.5) и Раствор для удаления эндотоксинов. Процедуру выделения плазмидной ДНК проводили согласно инструкции производителя (<http://evrogen.ru/kit-user-manuals/BC124.pdf>).

3.2 Получение псевдовиральных частиц и лентивирусная трансдукция

Для наработки псевдовиральных частиц использовали клеточную линию эмбриональной почки человека HEK293T, для этого клетки за день до трансфекции рассеивали на 10 см чашки Петри и культивировали на среде Opti-MEM (Gibco, США). Когда конфлюентность клеток достигала 70 %, проводили подготовку смеси для трансфекции. Для этого в пробирке смешивали 3 раствора: содержащий трансфекционную плазмиду psPAX2 (9,75 мкг), трансфекционную плазмиду pMD2.G (5,27 мкг) и лентивирусную плазмиду pLKO.1 (12,3 мкг) соответственно. Затем к смеси добавляли трансфекционный реагент PEI MAX (Polyscience, США) в соотношении 4 части на 1 часть ДНК и перемешивали. Смесь инкубировали 15 мин на комнатной температуре, после чего по каплям добавляли в культуральную чашку с клетками. На следующее утро среду с PEI MAX меняли.

По истечению 48 часов супернатант, содержащий вирусные частицы отбирали и проводили центрифугирование при 3000 g в течение 10 минут при 4°C.

На следующем этапе работы вирусные частицы из супернатанта очищались с использованием трех методов: ионообменной хроматографии, ультрафильтрации и ультрацентрифугирования.

Сначала вирусные частицы очищали с помощью хроматографии на колонке с анионообменным носителем DEAE-целлюлозой при температуре 4 °С. Предварительно колонку подготавливали, пропуская через нее буферы в следующей очередности: сначала пять объемов колонки (5 мл) начального буфера (100 мМ NaCl), затем один объем элюирующего буфера (1М NaCl). Удаление примеси свободной ДНК перед этапом очистки к супернатанту добавляли 1 мМ MgCl₂ и 200U Benzonase (Merck, США). Затем инкубировали при 37°С 30 минут. Пробу в объеме 1 мл, содержащую вирионы, затем наносили на колонку, проводили хроматографию со скоростью потока элюирующего буфера (1М NaCl) 0,5 мл/мин. Не связавшийся с носителем материал собирали и измеряли оптическую плотность при длине волны 280 нм. Колонку промывали 0,01 М натрий-фосфатным буфером с 0,15 М NaCl pH 7,4 с контролем оптической плотности при длине волны 280 нм. Затем проводили элюцию тем же буфером, но с 0,75 М NaCl. Оптическую плотность элюата контролировали также при длине волны 280 нм. После анионообменной хроматографии проводили обессоливание полученного материала при помощи колонки Econo-Pac® 10DG Desalting Column (Bio-Rad, США). Завершив обессоливание, оптическую плотность пробы измеряли при длине волны 280 нм.

Ультрафильтрацию вирусных частиц производили центрифугированием в течение 30 минут при 3000 g в центрифужных концентраторах Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit (Merck, США) с диапазоном фракционирования 100 кДа.

Для осаждения вирусных частиц из супернатанта использовали ультрацентрифугирование при 72000 g и 4°С в течение 2 часов. Супернатант отбрасывали, а осадок растворяли охлажденным буфером PBS.

Сравнение результатов проводилось при помощи электрофореза вирусных частиц с окраской SYPRO Ruby Protein Gel Stain (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя.

3.3 Клеточные линии

В данной работе использовали клеточные линии:

- клеточная линия MCF-7 положительного по экспрессии эстрогенового рецептора рака молочной железы (положительная экспрессия эстрогенового рецептора встречается в примерно 70% случаев РМЖ);

- клеточная линия рака молочной железы MDA-MB-231 с тройным отрицательным статусом экспрессии генов, кодирующих рецепторы к прогестерону, эстрогену и эпидермальному фактору роста.

Условия культивации клеток: клетки культивировали при температуре 37°C в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂. Клеточные линии культивировали в среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей 5% эмбриональную бычью сыворотку (HyClone, США) и смесь антибиотиков: пенициллин (100 МЕ/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл) (Биолот, Россия).

3.4 Фенол-хлороформное выделение РНК, проведение обратнотранскриптазной реакции для получения кДНК и анализ экспрессии генов ПЦР в реальном времени

Для выделения РНК использовался метод фенол-хлороформной экстракции по Чомзинскому (Chomczynski, Sacchi, 2006) с использованием реагента Extract RNA (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя (<http://evrogen.ru/kit-user-manuals/extractRNA.pdf>). В культуральные чашки диаметром 60 мм добавляли 1 мл реагента Extract RNA. Далее чашки инкубировали в течение 10 мин, затем клеточный лизат переносили в пробирки. В них добавляли по 200 мкл хлороформа, перемешивали встряхиванием и инкубировали 3-5 мин при комнатной температуре. Затем образцы центрифугировали при 12 000 g и температуре 4°C в течение 15 мин, отбирали верхнюю прозрачную РНК-содержащую фазу в новые пробирки и добавляли 500 мкл изопропилового спирта, плавно перемешивали переворачиванием. После этого образцы центрифугировали при 12 000 g и температуре 4°C в течение 10 мин. Полученный супернатант удаляли, к осадку РНК добавляли 1 мл 75% этилового спирта, центрифугировали при 12 000 g и температуре 4°C в течение 5 мин. После этого супернатант удаляли, полученный осадок РНК высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 10 мин и растворяли затем в деионизованной воде, не содержащей РНКаз.

Синтез кДНК проводили с помощью набора MMLV RT Kit (Евроген, Россия). В состав набора входят: MMLV ревертаза, (MMLV RT, 100 ед/мкл), 5x буфер для синтеза первой цепи (280 mM Трис-НСl, pH 8.7; 375 mM КСl; 30 mM MgCl₂), DTT (20 mM), смесь dNTP (dNTP mix, 10 mM каждого), олиго(dT) праймер (Oligo(dT)17-primer, 20 мкМ), случайный декануклеотидный праймер (Random (dN)10-primer, 20 мкМ), буфер для

разведения MMLV ревертазы (50 мМ Трис-НСl, рН 7.5; 300 мМ NaCl; 1 мМ EDTA; 1 мМ DTT; 50% глицерин; 0.01% Triton X-100), стерильная вода свободная от РНКаз. На первом этапе в стерильные пробирки добавляли компоненты реакции, представленные в табл. 1, проводили отжиг праймеров (табл. 2) в течение 3 мин при температуре 70°C.

Таблица 1.

Состав смеси на этапе отжига праймеров.

Тотальная РНК	1 мкг
Праймеры oligo(dT) ₁₈ (100 пмоль)	1 мкл
Деионизованная вода	7 мкл

Таблица 2.

Праймеры, использованные для проведения ПЦР в реальном времени.

Ген (белок)	Последовательность праймера 5'-3'
<i>GAPDH</i>	Forward: GAGGTCAATGAAGGGGTCAT
	Reverse: AGTCAACGGATTTGGTCGTA
<i>Puma</i>	Forward: GTGACCACTGGCATTTCATTTG
	Reverse: TCCTCCCTCTTCCGAGATTT

<i>Bax</i>	Forward: CGAACTGGACAGTAACATGGA
	Reverse: CAGTTTGCTGGCAAAGTAGAAA
<i>Bak</i>	Forward: AGGAGCAGGTAGCCCAGGAC
	Reverse: CCAGTTGATCCGCTCTCAAAC
<i>Bad</i>	Forward: CATGTGGACCTGTCACTGTCTTGTA
	Reverse: GAAGATCAGCCGGCGTTTG
<i>CDH</i>	Forward: TCCATTTCTTGGTCTACGCC
	Reverse: CACCTTCAGCCAACCTGTTT
<i>VIM</i>	Forward: TGTCCAAATCGATGTGGATGTTTC
	Reverse: TTGTACCATTCTTCTGCCTCCTG
<i>SNAIL</i>	Forward: GCTGCAGGACTCTAATCCAGA
	Reverse: ATCTCCGGAGGTGGGATG

3.5 Разделение белков в полиакриламидном геле и вестерн-блоттинг

Оценку содержания белков проводили с помощью электрофоретического разделения в ПААГ и последующего анализа вестерн-блоттингом с использованием

моноклональных антител, специфичных к определенному белку. Пробоподготовка осуществляли следующим образом:

Экстракт клеток получали используя лизирующий буфер RIPA, содержащей смесь анионных и неионных детергентов: 0,1% SDS, 0,5% дезоксихолат натрия, 1% нонидет P-40, 0,1% Tween-20, 1 mM ЭДТА, 50 mM NaF, 1 mM PMSF, 10 mM KCl, 150 mM NaCl в 10 mM трис-HCl pH 7,4. 300 мкл буфера RIPA добавляли из расчета на 2×10^6 клеток, инкубировали в течение 30 мин при 4°C при постоянном перемешивании. Далее центрифугировали полученную суспензию в течении 5 мин при 13 000 g. Затем полученный супернатант отбирали в пробирки и добавляли к нему 1 x буфер Лэмлли для проб (5% SDS, 50% глицерол, 0,1% бромфеноловый синий, 250 mM трис-HCl pH 8,8, 5% β -меркаптоэтанол). После этого пробы кипятили в течение 5 мин.

Электрофоретическое разделение белков проводили в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) (Laemmli, 1970). Диск-электрофорез проводили в ПААГ, формируя его из смеси акриламид/бисакриламид на соответствующем буфере, получая 4% концентрирующий и 13% разделяющий гели.

Для приготовления 50 мл раствора разделяющего геля использовали 16,3 мл смеси, содержащей акриламид (AA) и N,N'-метиленбисакриламид (бисAA) в соотношении 37,5:1, 9,4 мл 2 M трис-HCl pH 8,8, 0,3 мл 20% SDS, 23,6 мл дист.воды, 20 мкл TEMED, 500 мкл 10% ПСА. Раствор заливали в камеру для заливки геля и наслаивали сверху 0,3 мл изопропилового спирта для предотвращения взаимодействия геля с окружающим воздухом. По завершению полимеризации изопропиловый спирт удаляли.

Для приготовления 50 мл раствора концентрирующего геля использовали 5 мл смеси, содержащей AA и бисAA в соотношении 37,5:1, 3,8 мл 2 M трис-HCl pH 6,8, 0,3 мл 20% SDS, 4 мл дист.воды, 60 мкл TEMED, 600 мкл 10% ПСА. Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере TGB с pH 8.3, содержащем 0,1% SDS, по методу Лэмлли (Laemmli, 1970).

SDS придает белкам отрицательный заряд за счет взаимодействия с отрицательно заряженными сульфогруппами. Отрицательно заряженные белки мигрируют от катода к аноду.

β -меркаптоэтанол использовали как восстанавливающий агент для дисульфидных связей. После проведенной обработки белки денатурируют, обладают одинаковым удельным зарядом и разделяются обратно пропорционально логарифму их молекулярной массы. Электрофорез проводили в пластинках толщиной 1 мм при напряжении 140 В в течение 1,5 часов.

Один из гелей с одинаковым нанесением проб после проведения электрофореза использовался для визуализации белков с помощью красителя, а другой – для процедуры вестерн-блоттинга. Белки и пептиды окрашивали реагентом Coomassie Brilliant Blue G-250. Раствор красителя содержал 0,1% Coomassie Brilliant Blue G-250, 25% метанол, 5,5% формалин. Гель инкубировали 30 минут в ванночке с красителем, потом отмывали 5% уксусной кислотой до появления полос и прозрачного фона.

Перед вестерн-блоттингом гели отмывали от SDS в трис-глициновом буфере с pH 8.6, содержащем 10% метанола, в течение 20 мин. Затем осуществляли перенос белков на PVDF мембрану с диаметром пор 0,45 мкм (Bio-Rad, США) в охлажденном буфере TGB, содержащем 10% метанола, в течение 60 мин при напряжении 100 В с помощью прибора Mini-PROTEAN (Bio-Rad, США).

Завершив перенос, мембрану отмывали PBS, содержащем 0,1% Tween-20, в течение 15 мин. Затем блокировали с помощью 5% раствора обезжиренного молока в PBS, содержащем 0,1% Tween-20, для предотвращения неспецифического связывания антител в течение 1 часа при комнатной температуре.

Затем осуществляли окраску мембраны с помощью моноклональных антител специфичных к белку NR4A1 фирмы Abcam (AB109180). Растворы (разведение 1:1000) антител готовили на основе 5% раствора обезжиренного молока в PBS, содержащем 0,1% Tween-20. Мембраны с первичными антителами Abcam (AB109180) инкубировали 12-16 часов при 4°C, затем мембраны отмывали четыре раза по 5 мин с помощью буфера PBS, содержащем 0,1% Tween-20. Затем проводили инкубацию мембраны в растворе вторичных антител Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody (разведение 1:10000), конъюгированных с пероксидазой хрена, в течение часа при комнатной температуре. Мембраны также отмывали четыре раза по 5 мин от вторичных антител для предотвращения неспецифического сигнала буфером PBS, содержащем 0,1% Tween-20. Детекцию пероксидазной активности проводили с помощью набора реагентов Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, США) для хемилюминесцентной детекции

конъюгатов с пероксидазой хрена, в состав которого входит Clarity Western Peroxide Reagent и Clarity Western Luminol/Enhancer Reagent, и системы гель-документации ChemiDoc™ Touch Gel Imaging System (Bio-Rad, США).

3.6 Тетразолиевый тест (МТТ-тест)

МТТ-тест позволяет колориметрически определить метаболическую активность клеток с помощью тетразолиевого красителя (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид). Восстановление желтого тетразолиевого реагента в нерастворимый фиолетовый формазановый краситель под действием НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктазных ферментов (в особенности, НАДФ-Н оксидазы) может использоваться для оценки количества жизнеспособных клеток. МТТ-тест подходит для изучения цитотоксического действия химиотерапевтических препаратов на клеточные линии.

Для проведения теста клетки (MCF-7 и MDA-MB-231) рассаживали в лунки 96-луночного планшета из расчета 4×10^3 клеток на лунку. Через сутки в лунки была добавлена культуральная среда с доксорубицином в пяти повторах в концентрациях от 0,5 до 4,5 мкМ с шагом 0,5 мкМ (или цисплатином в концентрациях от 10 мкМ до 80 мкМ с шагом в 10 мкМ). Через 24 ч (или 48 ч) после начала обработки в каждую лунку добавляли по 10 мкл раствора МТТ в PBS с концентрацией 5 мг/мл, затем планшет инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 3 ч. Далее из лунок отбирали среду, в каждую лунку добавляли по 100 мкл солюбилизирующего раствора (4 мМ HCl, 0,1% Nonidet P-40 в изопропиловом спирте), инкубировали в темноте при покачивании до момента полного растворения кристаллов формазана в течение 30 мин. Оптическую плотность измеряли при длине волны 595 нм на фотометре для микропланшетов iMark компании Bio-Rad. Процент выживших клеток рассчитывали как отношение средней оптической плотности в контрольных лунках, которое принимается за 100%, к средней оптической плотности в лунках с обработанными клетками.

3.7 Цитофлуориметрический анализ клеточного цикла с помощью PI метода окрашивания ДНК

Анализ клеточного цикла клеток линии MCF-7 проводили с помощью проточной цитометрии на цитофлуориметре Beckman Coulter Epics XL с окрашиванием ДНК

пропидий йодидом. Данный метод позволяет определить процент популяции клеток, находящейся на каждой из стадий клеточного цикла.

В ходе пробоподготовки клетки собирали с культуральных чашек и промывали два раза PBS. Затем осадок клеток ресуспендировали в 0,01 % растворе сапонины в PBS и инкубировали 20 мин для пермеабилзации мембраны. По завершению инкубации клетки три раза промывали PBS. Затем осадок ресуспендировали в 400 мкл PBS. Для окрашивания добавляли по 16 мкл раствора пропидий йодида (1 мг/мл) (Invitrogen, США) и 8 мкл РНКазы А (10 мкг/мл) (Thermo Scientific, США), клетки инкубировали при 37°C в термостате в течение 15 мин.

4. Результаты

4.1 Подтверждение лентивирусной трансдукции и выполнения нокдауна *Nr4a1* клеточных MCF-7 и MDA-MB-231 линий вестерн-блоттингом

Для подтверждения эффективности лентивирусной трансдукции в клеточных линиях MCF-7 и MDA-MB-231 был проведен вестерн-блоттинг с использованием моноклональных антител к NR4A1. Эксперимент показал, что в контрольных клеточных линиях после трансдукции неспецифическими РНК (scrambled RNA) была показана экспрессия NR4A1. Однако при нокдауне с помощью shRNA не наблюдалась экспрессия NR4A1 в клеточных лизатах (рис. 3 и рис. 4). Полученные результаты свидетельствуют об эффективном прохождении вирусной трансдукции в клеточных линиях MCF-7 и MDA-MB-231.

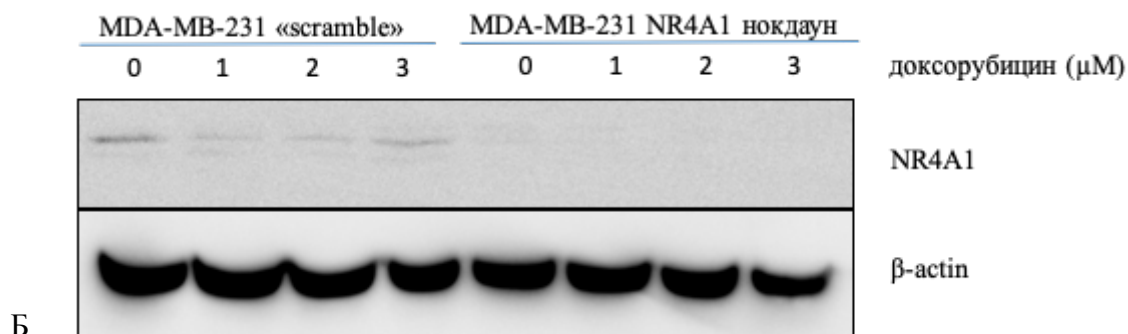
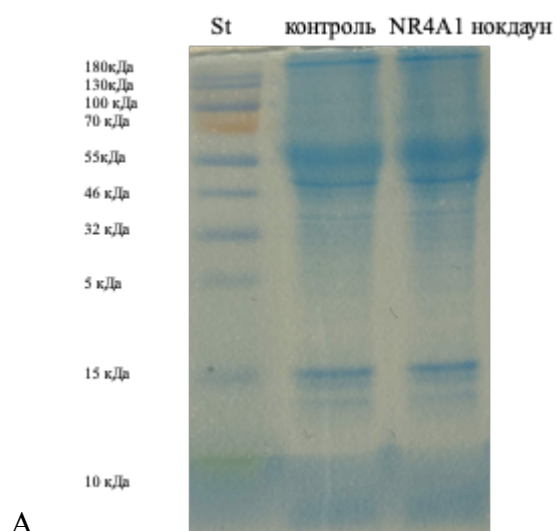
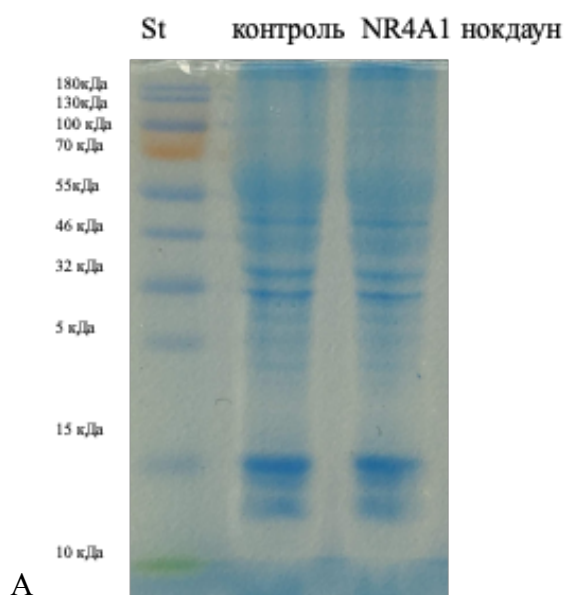


Рис. 3. Определение уровня белка NR4A1 в клеточной линии MDA-MB-231 после выполнения вирусной трансдукции:

А) Электрофореграмма проб: St - стандарт молекулярных масс (10-180 кДа) PageRuler Protein Ladder, контроль - клеточный лизат MDA-MB-231 с контрольной плазмидой (без обработки доксорубицином; с обработкой доксорубицином в концентрации 1, 2, 3 мкМ в течение суток), Nr4a1 нокдаун - клеточный лизат MDA-MB-231 shRNA к мРНК Nr4a1 (без обработки доксорубицином; с обработкой доксорубицином в концентрации 1, 2, 3 мкМ в течение суток). Диск-электрофорез в 13 % ПААГ в денатурирующих условиях в присутствии SDS по методу Лэммли (Laemmli, 1970). Окрашивание Coomassie Brilliant Blue G-250;

Б) Результат вестерн-блоттинга с использованием моноклональных антител, специфичных к белку NR4A1 фирмы Abcam (AB109180): MDA-MB-231 “scramble” – пробы, не содержащие shRNA к мРНК транскрипту Nr4a1, MDA-MB-231 NR4A1 нокдаун – с РНК интерференцией, блокирующей трансляцию мРНК Nr4a1. Контроль – β -актин (моноклональные антитела Sigma A2228).



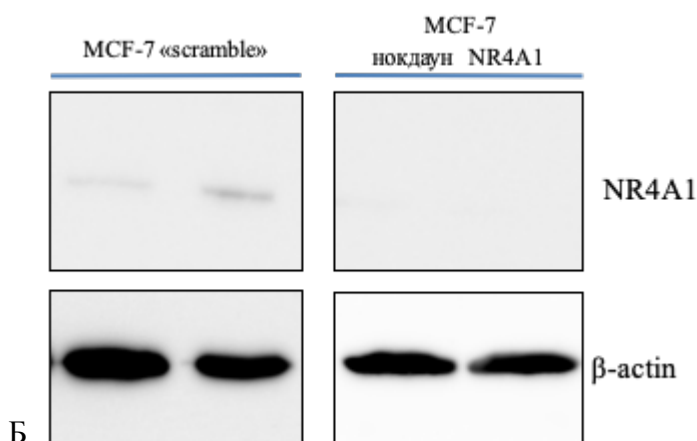


Рис. 4. Определение уровня белка NR4A1 в клеточной линии MCF-7 после выполнения вирусной трансдукции:

А) Электрофореграмма проб: *St* - стандарт молекулярных масс (10-180 кДа) *PageRuler Protein Ladder*, контроль - клеточный лизат MCF-7 с нефункциональным РНК-интерферирующим транскриптом, *Nr4a1* нокдаун - клеточный лизат MCF-7 с РНК-интерференцией к мРНК *Nr4a1*. Диск-электрофорез в 13 % ПААГ в денатурирующих условиях в присутствии SDS по методу Лэммли (Laemmli, 1970). Окрашивание *Coomassie Brilliant Blue G-250*;

Б) Результат вестерн-блоттинга с использованием моноклональных антител, специфичных к белку NR4A1 фирмы *Abcam* (AB109180): MCF-7 “scramble” – пробы, не содержащие *shRNA* к мРНК транскрипту *Nr4a1*, MCF-7 нокдаун NR4A1 – с РНК-интерференцией к мРНК *Nr4a1*, блокирующей трансляцию мРНК *Nr4a1*. Контроль нагрузки – β -актин (моноклональные антитела *Sigma* A2228).

4.2 Изучение выживаемости клеточных линий с разным статусом экспрессии *Nr4a1* при обработке химиотерапевтическими препаратами с помощью МТТ-теста

Восприимчивость клеток на действие ДНК-повреждающих агентов исследовали с помощью колориметрического МТТ-теста.

На основании данных о выживаемости клеток после обработки химиотерапевтическими агентами оценивали вклад экспрессии гена, кодирующего NR4A1, на резистентность к лекарственным препаратам.

Клетки MCF-7 использовали для проведения МТТ-теста. Клетки рассаживали в лунки 96-луночного планшета, обрабатывали доксорубицином (концентрациях 0,5; 1; 1,5;

2; 2,5; 3; 3,5 и 4 мкМ) в течение 24 ч. В лунки затем добавляли раствор МТТ реагента (концентрация 5 мг/мл) для определения жизнеспособности клеток. Результат представлен на рис 5.

Также была оценена выживаемость клеток MCF-7 при добавлении ДНК-повреждающего агента цисплатина (в концентрациях 40, 50, 70 и 80 мкМ), который является ДНК алкилирующим агентом, вызывающим однонитевые разрывы ДНК. Клетки обрабатывали в течение суток. Был использован раствор МТТ для оценки количества живых клеток. Результат эксперимента представлен на рис 6.

В обоих случаях мы наблюдали пониженную выживаемость клеток MCF-7 с нокаутом по *Nr4a1* относительно контрольной клеточной линии.

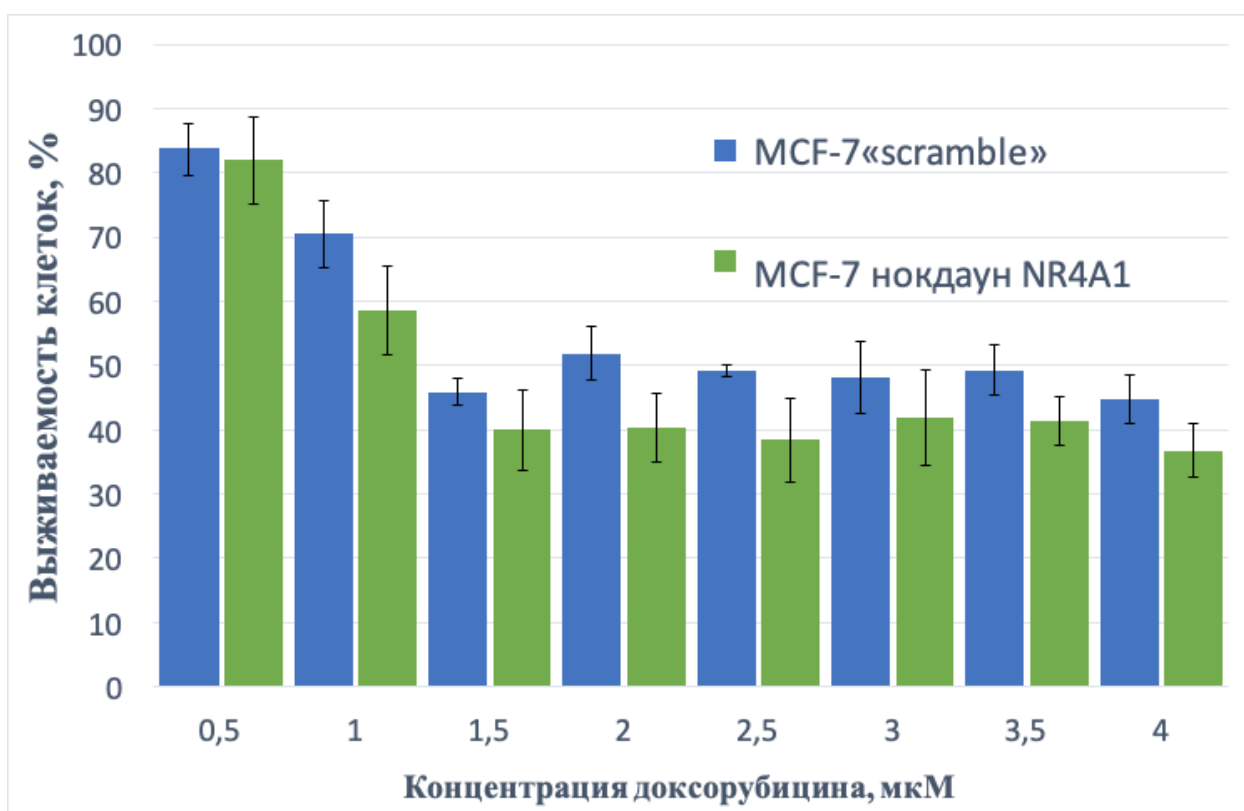


Рис. 5. Анализ выживаемости клеточной линии MCF-7 после обработки доксорубицином в течение 24 ч с помощью МТТ-теста.

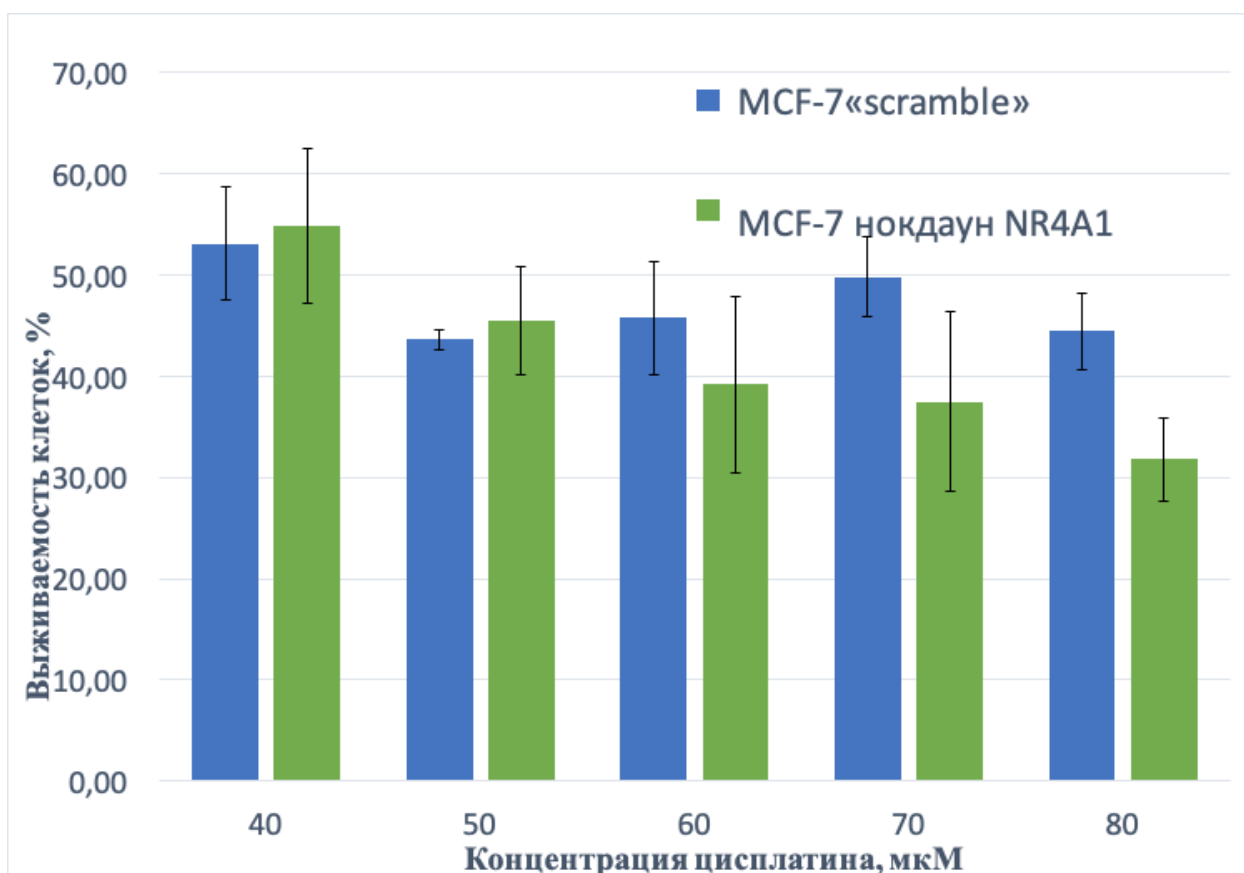


Рис. 6. Анализ выживаемости клеток линии MCF-7 после обработки цисплатином в течение 24 ч с помощью МТТ-теста.

Также с помощью МТТ-теста была оценена выживаемость клеточной линии MDA-231 после обработки цисплатином и гемцитабином. Клетки были обработаны цисплатином (в концентрациях 40, 50, 60, 70 и 80 мкМ) в течение 24 ч. Затем в лунки добавляли раствор МТТ реагента (концентрация 5 мг/мл) для оценки количества выживших клеток. Результат представлен на рис 8.

Также клеточные линии MDA-MB-231 были обработаны ингибитором синтеза ДНК гемцитабином (в концентрациях 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15, 25 и 50 мкМ) в течение 24 часов. Раствор МТТ использовали для оценки количества живых клеток. Результат эксперимента представлен на рис 7.

Эксперименты показали пониженную выживаемость клеток линии MDA-MB-231 с нокдауном по *Nr4a1* по отношению к контрольной клеточной линии.

На основании полученных результатов можно предположить, что экспрессия *Nr4a1* может являться фактором резистентности к химиотерапевтическим ДНК-повреждающим препаратам.

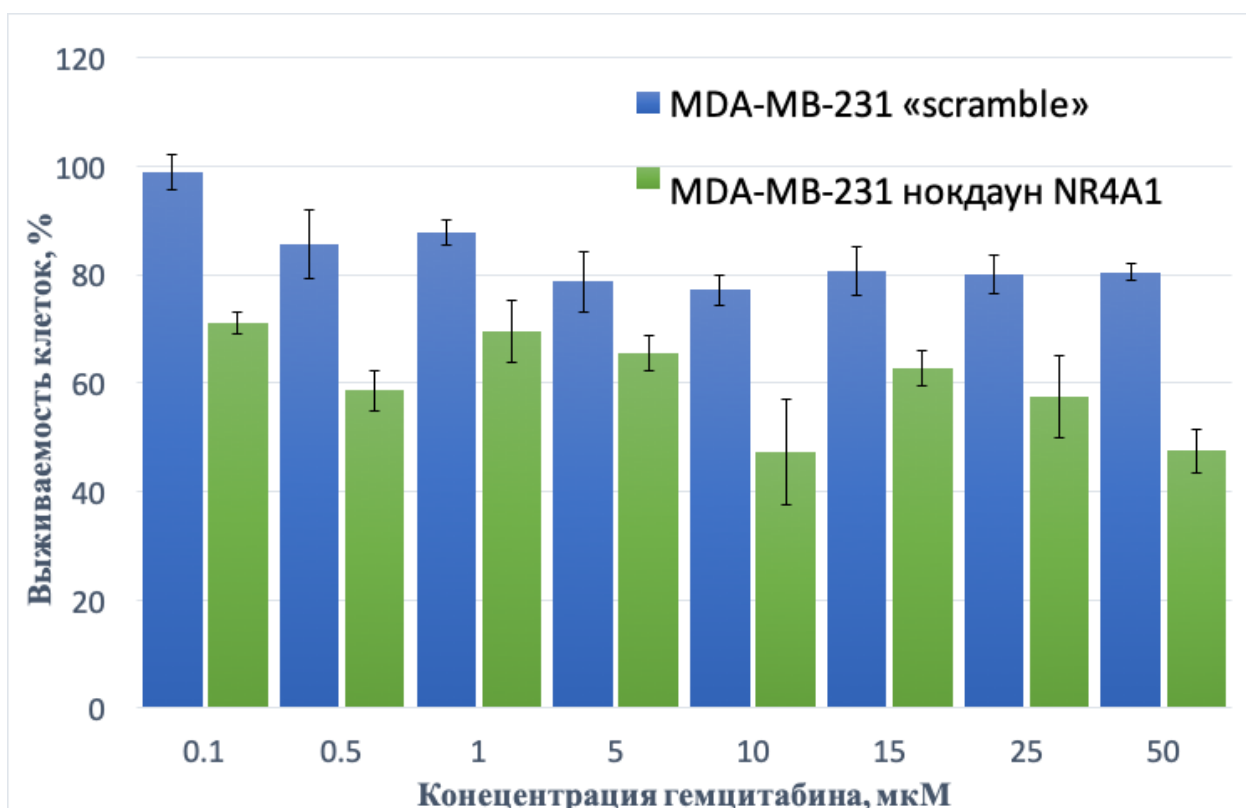


Рис. 7. Анализ выживаемости клеток линии MDA-MB-231 после обработки гемцитабином в течение 24 ч с помощью МТТ-теста.

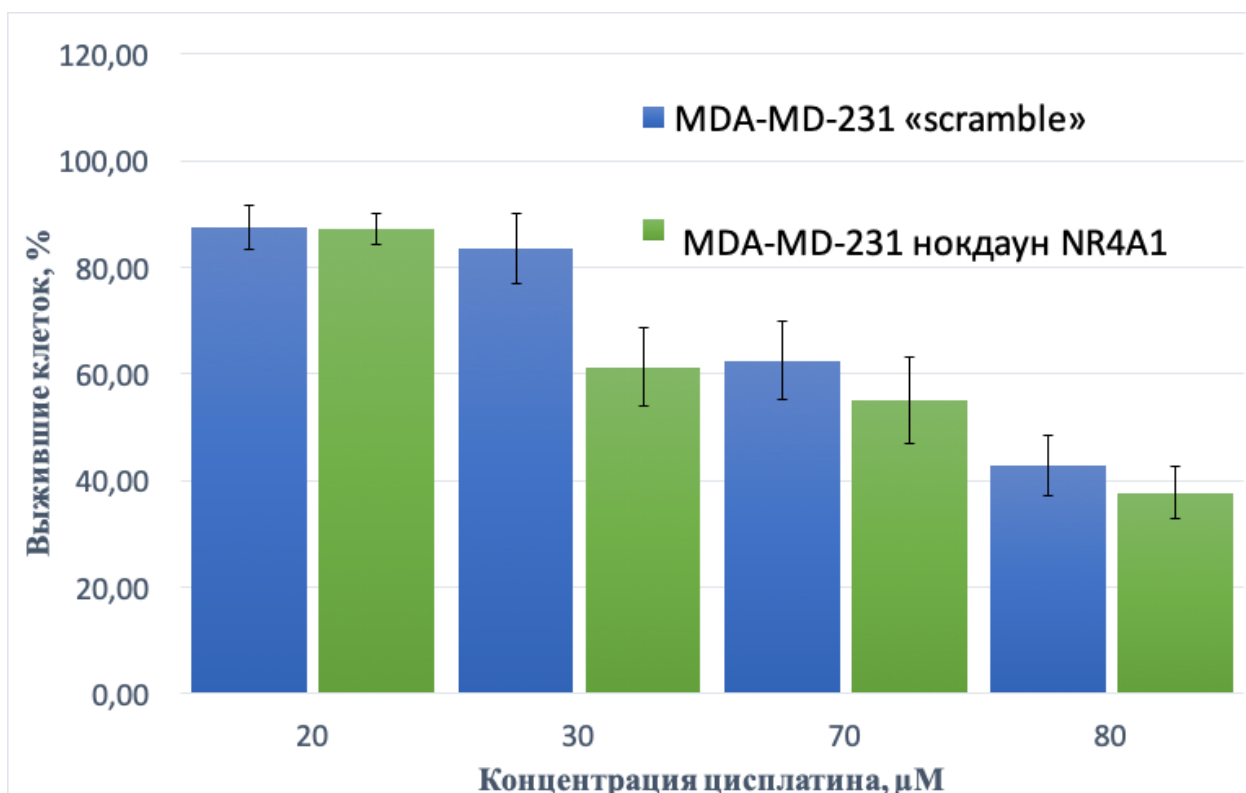


Рис. 8. Анализ выживаемости клеток линии MDA-MB-231 после обработки цисплатином в течение 24 ч с помощью МТТ-теста.

4.3 Определение влияния ядерного рецептора NR4A1 на экспрессию генов, кодирующих про-апоптотические белки *Bax*, *Bad* и *Puma* после обработки доксорубицином

В ответ на различные стимулы, в том числе повреждение ДНК, NR4A1 способен связываться с промоторами про-апоптотических генов и активировать или ингибировать их транскрипцию (Bouzas-Rodríguez et al., 2012). Мы провели исследование относительной экспрессии генов *Puma*, *Bax* и *Bad* с помощью ПЦР в реальном времени.

В клетках MCF-7 с трансдукцией неспецифической РНК по результатам ПЦР в РВ мы наблюдали повышенную в 4-5 раз относительную экспрессию про-апоптотического гена *Puma* по сравнению с клетками, в которых был осуществлен нокадаун *Nr4a1* (рис. 9 А). Увеличение относительной экспрессии мРНК про-апоптотических генов *Bak*, *Bax* и *Puma* в 4-5 раз также было продемонстрировано в контрольной клеточной линии MDA-MB-231 (рис. 9 Б, В, Г).

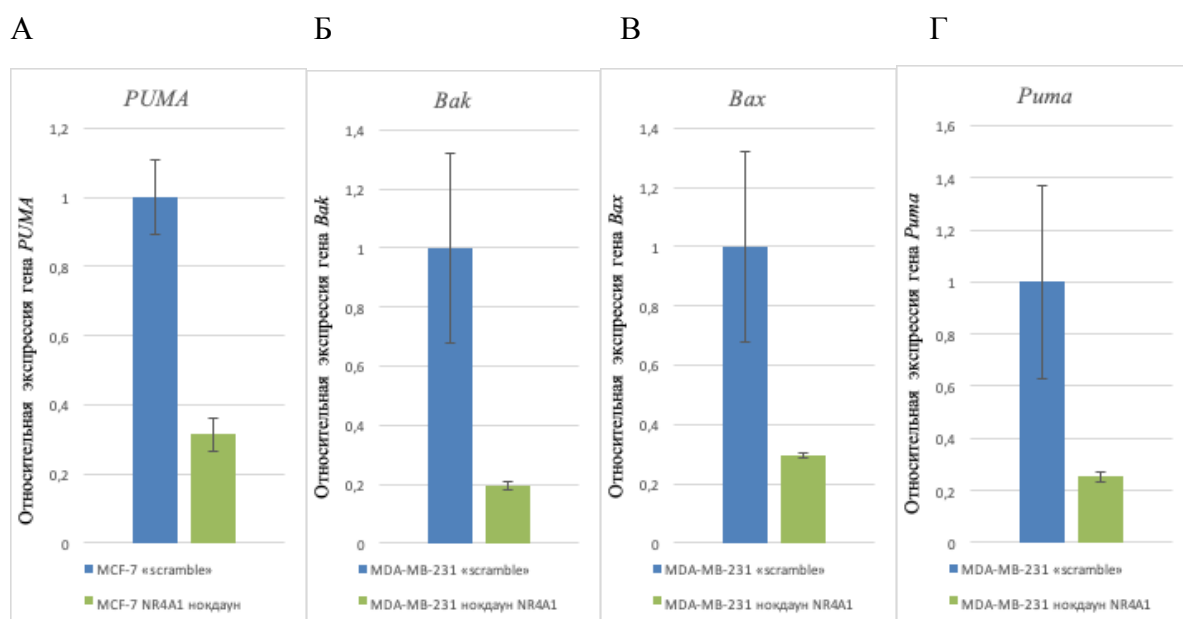
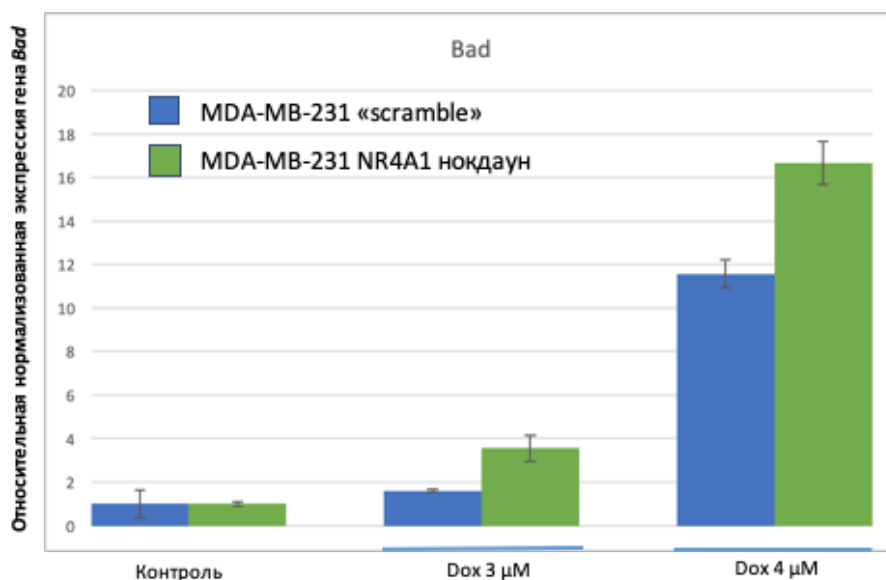


Рис. 9. Определение влияния NR4A1 на экспрессию мРНК про-апоптотических генов: А – определение относительной экспрессии гена *Puma* в клеточной линии MCF-7; Б, В, Г – определение относительной экспрессии генов *Bad* (А), *Bax* (Б) и *Puma* (В) с помощью ПЦР в реальном времени в клеточной линии MDA-MB-231. Нормализацию относительной экспрессии проводили по *GAPDH*.

При обработке ДНК-повреждающим препаратом доксорубицином в концентрациях 3 и 4 мкМ в течение суток наблюдали повышение уровня относительной экспрессии про-апоптотического гена *Bad* (3-4 и 15-17 раз соответственно) и *Bax* (в 1,5 раз при обработке 3 мкМ доксорубицином) в клеточной линии MDA-MB-231 с нокадаун *Nr4a1*.

А



Б

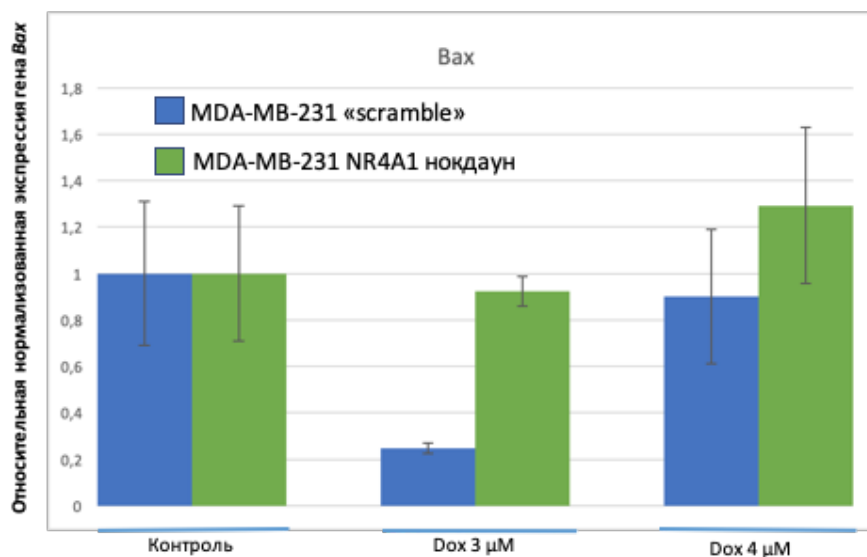


Рис. 10. Определение влияния ядерного рецептора NR4A1 на экспрессию про-апоптотических генов *Bad*, *Bax* и *Puma* после обработки клеток линии MDA-MB-231 доксорубицином в течение 24 часов:

А, Б – определение относительной экспрессии генов *Bad* (А) и *Bax* (Б) с помощью ПЦР в реальном времени. Нормализацию относительной экспрессии проводили по *GAPDH*.

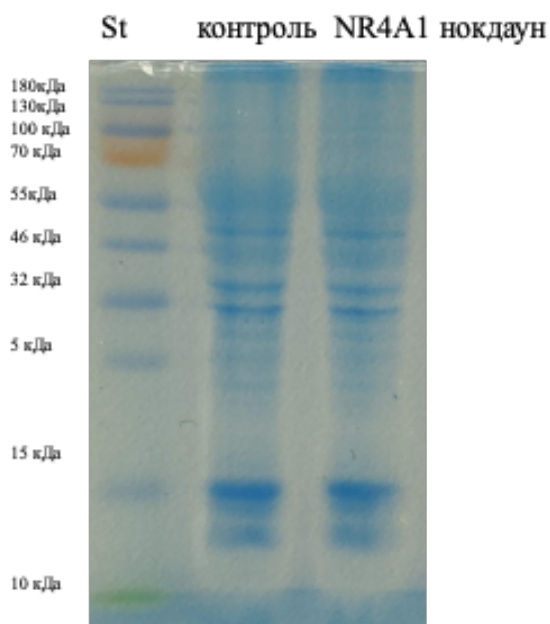
Устойчивость к апоптозу служит одним из механизмов развития множественной лекарственной устойчивости (Gillet, Gottesman, 2009). Одной из причин развития резистентности после обработки доксорубицином при экспрессии *Nr4a1* может являться снижение уровня мРНК про-апоптотических генов.

4.4 Определение влияния NR4A1 на уровень белков-регуляторов клеточного цикла при обработке химиотерапевтическими препаратами

Воздействие на клетки ДНК-повреждающими препаратами, как правило, приводит к изменениям в клеточном цикле. Уровень регулирующих клеточный цикл белков в клетках после обработки химиотерапевтическими агентами позволяет оценить корректность работы системы распознавания повреждений ДНК и контроля клеточного цикла (Kohn et al., 1994). Нарушение функционирования вышеприведенных систем является причиной возникновения лекарственной устойчивости.

С помощью вестерн-блоттинга был оценен уровень белка циклин D1 в клеточных линиях как до, так и после добавления доксорубицина. В ходе эксперимента клетки MCF-7 обрабатывали доксорубицином (концентрации 1 и 3 мкМ) в течение 24 ч, затем проводился вестерн-блот анализ.

А



Б

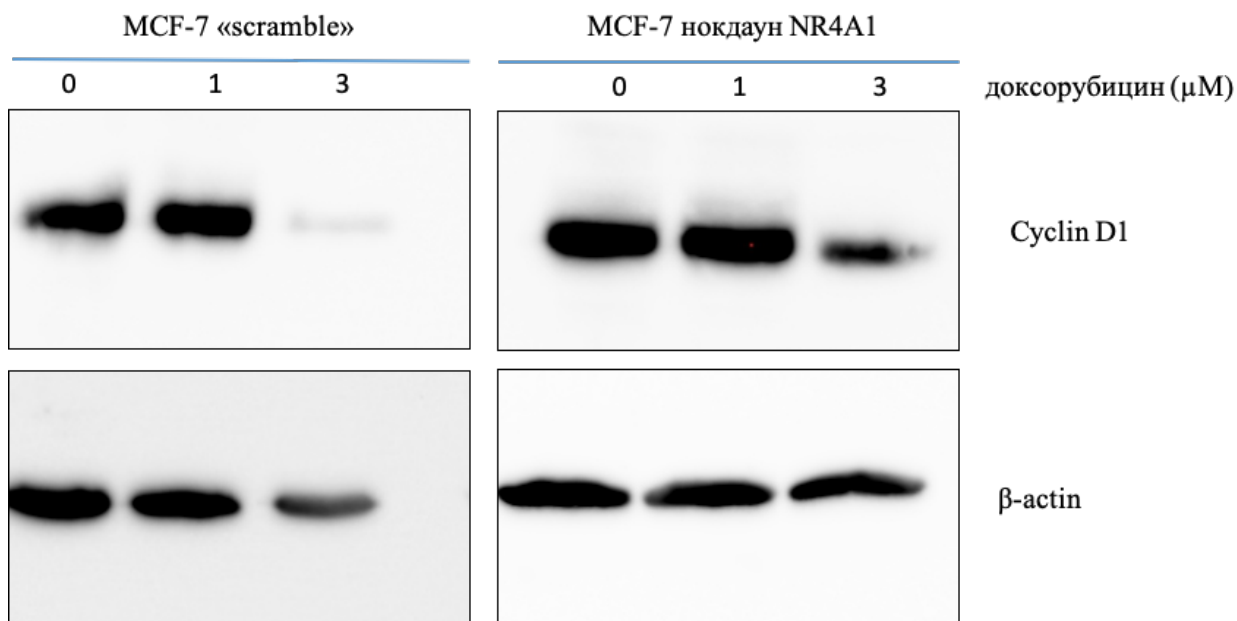


Рис. 10. Определение влияния ядерного рецептора NR4A1 в клеточной линии MCF-7 на уровень белков, регулирующих клеточный цикл:

А) Электрофореграмма проб: St - стандарт молекулярных масс (10-180 кДа) PageRuler Protein Ladder, контроль - клеточный лизат MCF-7 с нефункциональным РНК-интерферирующим транскриптом, Nr4a1 нокдаун - клеточный лизат MCF-7 с РНК-интерференцией к мРНК Nr4a1. Диск-электрофорез в 13 % ПААГ в денатурирующих условиях в присутствии SDS по методу Лэммли (Laemmli, 1970). Окрашивание Coomassie Brilliant Blue G-250;

Ladder, клеточный лизат MCF-7 с нефункциональным РНК-интерферирующим транскриптом, клеточный лизат MCF-7 с РНК-интерференцией к мРНК Nr4a1. Электрофорез проводился в 13 % ПААГ в денатурирующих условиях в присутствии SDS. Окрашивание Coomassie Brilliant Blue G-250;

Б) Результат вестерн-блоттинга с использованием моноклональных антител, специфичных к белку Cyclin D1 фирмы Thermo Fisher (RB-9041-P1): MCF-7 “scramble” – пробы, не содержащие shRNA к мРНК транскрипту Nr4a1 (без обработки доксорубицином; с обработкой доксорубицином в концентрации 1, 3 мкМ в течение суток), MCF-7 нокдаун NR4A1 – с РНК интерференцией к мРНК Nr4a1 (без обработки доксорубицином; с обработкой доксорубицином в концентрации 1, 3 мкМ в течение суток), блокирующей трансляцию мРНК Nr4a1. Контроль нагрузки – β-актин (моноклональные антитела Sigma A2228).

При обработке клеток доксорубицином в концентрации 3 мкМ мы наблюдали снижение уровня циклина D1 по сравнению с пробой без обработки, что соответствует остановке клеточного цикла в G1/S фазе клеточного цикла. В клетках с нокаутом *Nr4a1* наблюдали более высокий уровень белка циклина D1 по сравнению с клетками с контрольной трансдукцией.

4.5 Изучение влияния NR4A1 на экспрессию генов-маркеров эпителиального и мезенхимального фенотипов с помощью ПЦР в реальном времени

Клетки животных могут обладать эпителиальными, мезенхимальными чертами, а также их комбинацией. Основным маркером эпителиальных клеток является E-кадгерин, мезенхимальных – виментин, N-кадгерин и транскрипционные факторы эпителиально-мезенхимального перехода (SNAIL1, Zeb1/2, TWIST, SLUG) (Weinberg, 2014).

С помощью ПЦР в РВ мы исследовали относительную экспрессию мРНК генов *SNAIL*, *VIM*, *CDH*. Мы показали, что в клетках линии MCF-7 без подавления экспрессии *Nr4a1* наблюдается большая в 5-10 раз относительная экспрессия мРНК генов *VIM* и *SNAIL*. При этом в двух клеточных линиях наблюдали одинаковый уровень мРНК гена *CDH*, относительно содержания мРНК гена *GAPDH*.

А

Б

В

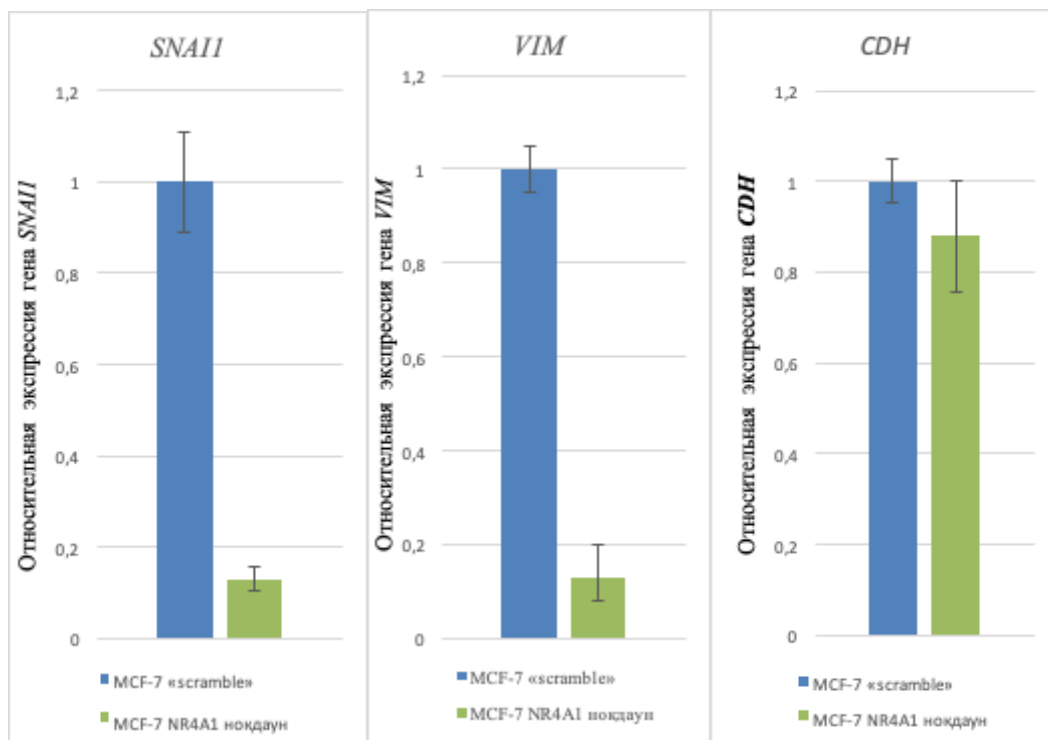
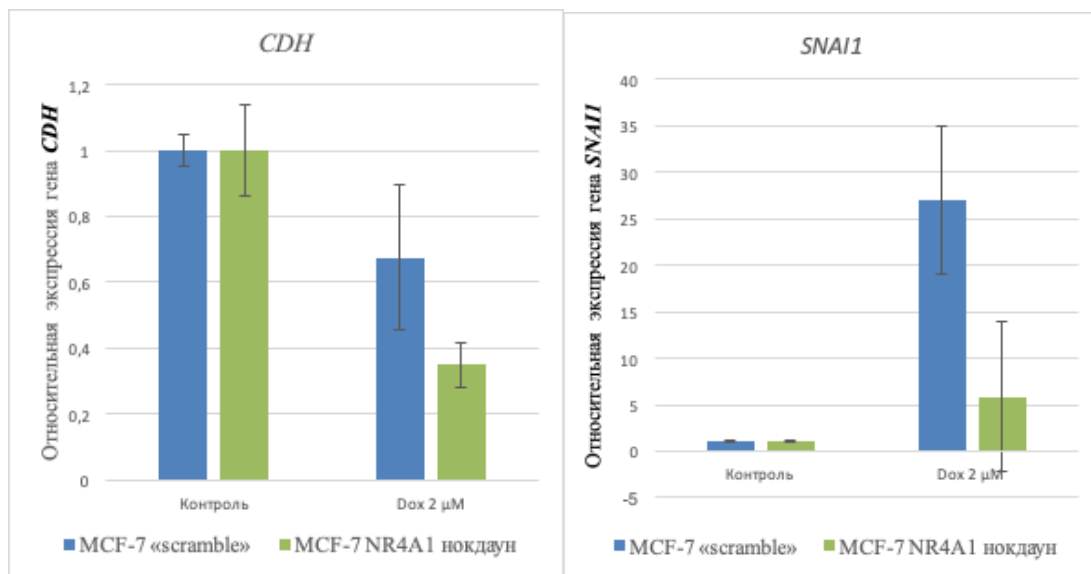


Рис. 11. Определение влияния ядерного рецептора NR4A1 на экспрессию мРНК генов-маркеров мезенхимального фенотипа *VIM*, *SNAI1* и эпителиального – *CDH*:

А, Б, В – определение относительной экспрессии генов *SNAI1* (А), *VIM* (Б) и *CDH* (В) с помощью ПЦР в реальном времени. Нормализацию относительной экспрессии проводили по *GAPDH*.

А

Б



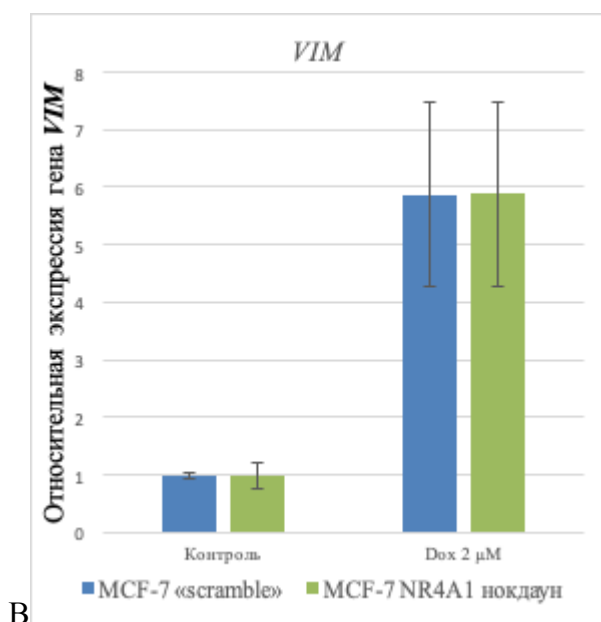


Рис. 12. Определение влияния ядерного рецептора NR4A1 на экспрессию мРНК генов-маркеров мезенхимального фенотипа *VIM*, *SNAIL* и эпителиального – *CDH* после обработки доксорубицином в концентрации 2 мкМ в течение 48 ч: А, Б, В – определение относительной экспрессии генов *SNAIL* (А), *VIM* (Б) и *CDH* (В) с помощью ПЦР в реальном времени. Нормализацию относительной экспрессии проводили по *GAPDH*.

В ходе дальнейшего анализа мы провели исследование относительной экспрессии мРНК генов *SNAIL*, *VIM*, *CDH* с помощью ПЦР в реальном времени после обработки клеток MCF-7 доксорубицином в концентрации 2 мкМ в течение 48 часов. В результате мы наблюдали повышение содержания мРНК гена в 25-35 раз, кодирующего транскрипционный фактор ЭМП *SNAIL*, в клеточной линии MCF-7 с контрольной трансдукцией. Также было продемонстрировано снижение уровня мРНК гена *CDH* в 0,4-0,6 раз и увеличение экспрессии мРНК *VIM* в 5-7 раз.

На основании полученных данных можно предположить, что клетки, содержащие NR4A1, обладают большей относительной экспрессией генов *SNAIL*, *VIM*, свойственных клеткам с мезенхимальным фенотипом. Приобретение клетками мезенхимальных черт может служить фактором резистентности к химиотерапии. Важно отметить, что на основании полученных результатов можно предположить, что клетки, содержащие NR4A1, обладают повышенным метастатическим потенциалом.

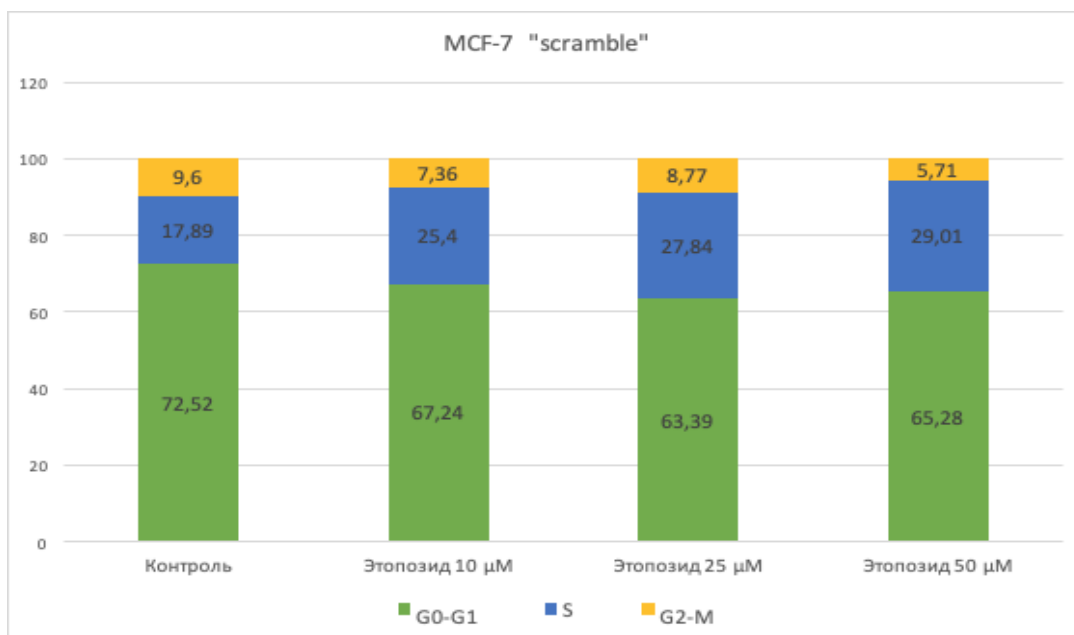
4.6 Изучение влияния экспрессии *Nr4a1* на клеточный цикл методом проточной цитометрии с окрашиванием ДНК пропидием йодидом

Для оценки влияния экспрессии *Nr4a1* на протекание клеточного цикла в популяции клеток MCF-7 мы использовали метод проточной цитометрии с окрашиванием ДНК красителем пропидием йодидом. Данный метод позволяет определить количество клеток, находящихся на каждой из фаз клеточного цикла. Клетки обрабатывали ДНК-повреждающим агентом этопозидом (аналогичный механизм действия как у доксорубицина) (концентрации 10, 25 и 50 мкМ) в течение 24 часов. Этопозид, как и доксорубин, является ингибитором топоизомеразы II. В данном случае применение этопозидов вместо доксорубицина обусловлено совпадением спектров возбуждения доксорубицина и пропидия йодида.

Обработка клеток химиотерапевтическими препаратами вызывает остановку пролиферации клеток. Зачастую это приводит к задержке клеточного цикла в G0-G1 фазе.

При концентрации этопозидов в 50 мкМ в клеточной линии MCF-7 с нокадауном гена *Nr4a1* наблюдали на 13 % большее содержание клеток в G0-G1 фазе, чем в линии без нокадауна. Наблюдаемое увеличение популяции клеток в G0-G1 фазе клеточного цикла при обработке этопозидом в концентрации 50 мкМ может свидетельствовать об устойчивости к ДНК-повреждающим препаратам.

А



Б

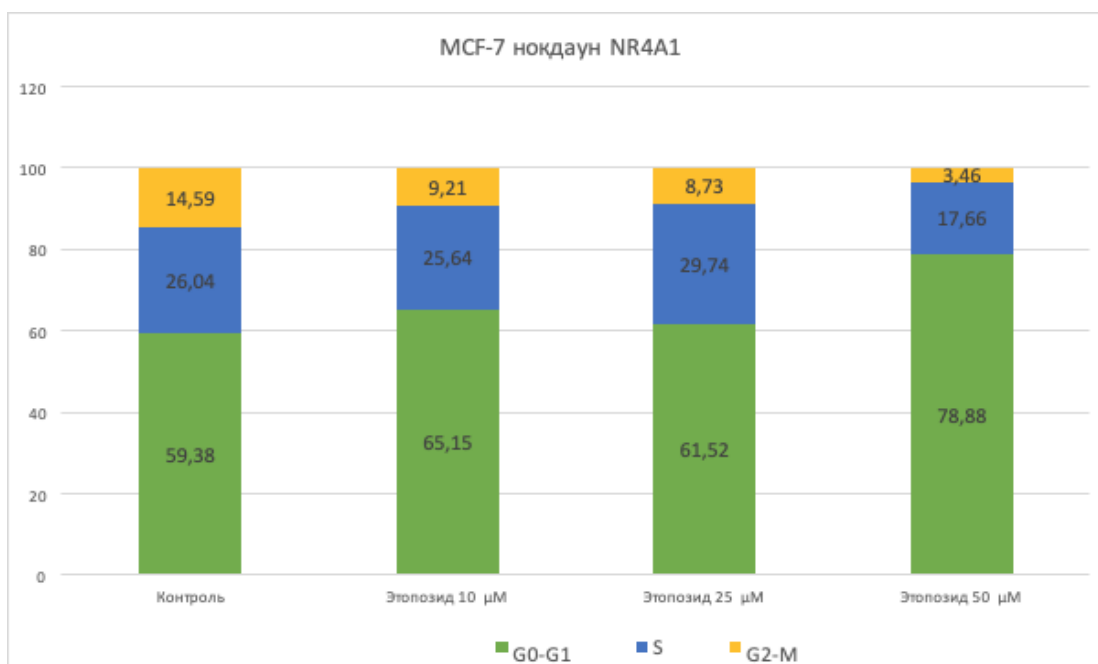


Рис . Результаты FACS-анализ клеточного цикла линии MCF-7 после обработки этопозидом в концентрациях 10, 25, 50 мкМ в течение 24 часов.

А – распределение популяции клеток MCF-7 с неспецифической интерферирующей РНК по фазам клеточного цикла: G0-G1 (выделено зеленым цветом), S – синим, G2-M – желтым;

Б – распределение популяции клеток MCF-7 с интерферирующей РНК к мРНК Nr4a1 по фазам клеточного цикла: G0-G1 (выделено зеленым цветом), S – синим, G2-M – желтым.

5. Обсуждение

Транскрипционный фактор NR4A1 известен как регулятор множества клеточных процессов таких как пролиферация, апоптоз, ангиогенез, репарация ДНК, метаболизм. Большинство функций NR4A1 связано с его транскрипционной активностью в ядре клетки. Как следствие того, что NR4A1 принимает участие в таких важных процессах в клетках, не удивительным является факт, что при большинстве злокачественных новообразованиях наблюдается изменение экспрессии гена *Nr4a1*. На данном этапе химиотерапия остается одним из основных методов лечения онкологических больных. Однако существует большая проблема развития резистентности у пациентов к противораковым препаратам. Поиск различных факторов, влияющих на чувствительность к препаратам, является актуальной проблемой как для современной медицины, так и для молекулярной биологии. Исходя из литературных данных, можно было предположить, что ядерный рецептор NR4A1 может влиять на чувствительность к различным ДНК-повреждающим препаратам. Однако как точно влияет и какой потенциальный молекулярный механизм изменения чувствительности к препаратам остается на данный момент неизвестно.

Прежде всего, мы оценили выживаемость клеток линий рака молочной железы с различным статусом экспрессии *Nr4a1* после обработки химиотерапевтическими препаратами. Результаты МТТ-теста показали, что при нокадауне *Nr4a1* наблюдается снижение выживаемости клеток линии MCF-7 и MDA-MB-231 при обработке цисплатином, доксорубицином и гемцитабином по сравнению с контрольной клеточной линией.

На следующем этапе работы мы попытались установить потенциальные молекулярные механизмы влияния NR4A1 на пролиферацию клеток и возникновения лекарственной устойчивости. Мы оценили относительную экспрессию мРНК про-апоптотических клеток в клеточных линиях с разным статусом экспрессии *Nr4a1* после обработки ДНК-повреждающими препаратами.

Из литературных данных известно, что NR4A1 способен активировать транскрипцию про-апоптотических генов (Bouzas-Rodríguez et al., 2012). В данной работе с помощью ПЦР в РВ мы показали, что контрольные клетки (содержащие NR4A1) обладали более высоким уровнем экспрессии мРНК про-апоптотических генов *Puma*, *Bad*, *Bak* в клеточной линии MDA-MB-231.

Клеточная линия MDA-MB-231 принадлежит к трижды негативному подтипу рака молочной железы. Он составляет 10-20 % случаев заболевания раком молочной железы и связан с худшим прогнозом, чем для других подтипов. Данный молекулярный подтип характеризуется отсутствием экспрессии генов, кодирующих рецепторы к прогестерону, эстрогену и эпидермальному фактору роста (HER2). В связи с этим при терапии трижды негативного рака молочной железы невозможно применение гормональных препаратов и лечение основывается на традиционных химиотерапевтических препаратах (Bianchini et al., 2016). Более того, было показано, что в трижды негативном раке молочной железы NR4A1 выполняет роль онкосупрессора и наблюдается сниженная экспрессия кодирующего его гена (Wu et al., 2017). Полученные нами данные подтверждают онкосупрессорную функцию NR4A1 в этом молекулярном подтипе рака молочной железы, что соответствует существующим литературным данным.

С помощью ПЦР в РВ мы показали, что воздействие на клетки ДНК-повреждающего препарата (доксорубицина) в клеточной линии, где экспрессируется *Nr4a1*, приводило к подавлению экспрессии про-апoptических генов.

Система регуляции клеточного цикла является важнейшим механизмом контроля пролиферации клеток. Многие белки-регуляторы клеточного цикла, такие как p53 и pRB, и их транскрипционные мишени относятся к прото-онкогенам. Воздействие на клетки химиотерапевтическими препаратами вызывает остановку клеточного цикла в точке G1/S или G2/M, что препятствует дальнейшей пролиферации раковых клеток. Отсутствие G1/S остановки при повреждении ДНК связано с нарушениями в системе распознавания ошибок в ДНК и системы контроля клеточного цикла. Аберрантная работа данных систем приводит к накоплению повреждений ошибок ДНК и способствует злокачественной трансформации, а также вызывает устойчивость к химиотерапевтическим препаратам (Ehrhardt et al., 2013; Shapiro, Harper, 1999).

Мы показали, что обработка клеток этопозидом приводит к увеличению популяции клеток в G0-G1 фазе клеточного цикла с подавленной экспрессией *Nr4a1*. На основании полученного результата можно предположить, что снижение экспрессии *Nr4a1* ведет к пониженной восприимчивости к ДНК-повреждающему агенту (этопозиду или доксорубицину).

Раковым опухолям характерно приобретение способности к метастазированию и инвазии. В основе метастазирования лежит активация программы эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), при которой происходит поляризация клеточного фенотипа от эпителиального к мезенхимальному. Зачастую раковые клетки полностью не утрачивают эпителиальные маркеры, а обладают смешанным эпителиально-

мезенхимальным фенотипом. При этом они приобретают способность к разрушению внеклеточного матрикса, подвижность и устойчивость к химиотерапии (Weinberg, 2014).

Мы исследовали относительную экспрессию мРНК нескольких основных маркеров эпителиального и мезенхимального фенотипа. Нами было показано, что клетки без нокдауна *Nr4a1* обладают более высоким уровнем экспрессии мРНК генов-маркеров ЭМП – *SNAIL* и *VIM*. Более того, при обработке доксорубицином мы наблюдали снижение уровня мРНК *CDH* и одновременно повышение *VIM* и *SNAIL*. Известно, что увеличение экспрессии *SNAIL* запускает ЭМП. *SNAIL* является ингибитором транскрипции *CDH* и активатором *VIM* и мезенхимальных генов (Mittal, 2017). На основании полученных результатов можно предположить, что наблюдаемое повышение экспрессии мРНК *VIM* и снижение увеличение коррелирует с повышением уровня *SNAIL*.

Повышенная экспрессия мРНК, связанных с мезенхимальным фенотипом генов, в контрольной клеточной линии MCF-7 по сравнению с клетками с нокдауном *Nr4a1* может служить причиной увеличения устойчивости к химиотерапевтическим препаратам. Надо отметить, что исследования относительной мРНК в данном случае не являются достаточными, так как многие из белков, кодируемые вышеописанными генами, подвергаются пост-трансляционной модификации. В дальнейшем мы планируем провести исследование эпителиально-мезенхимального перехода в клеточных линиях с различным статусом экспрессии *Nr4a1* также на уровне белка.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что NR4A1 является важным фактором онкогенеза в случае рака молочной железы. NR4A1 способен модулировать устойчивость к химиотерапевтическим препаратам и экспрессию метастатических генов. Возможными механизмами повышения резистентности к химиотерапии в экспрессирующих *Nr4a1* могут являться изменения в системе регуляции клеточного цикла, экспрессии про-апоптотических генов и эпителиально-мезенхимальной поляризации клеток.

В заключение надо отметить, что активность NR4A1 определяется множеством внеклеточных и внутриклеточных факторов и может варьироваться в широком диапазоне. В связи с этим большую актуальность представляют дальнейшие исследования функций NR4A1 в онкогенезе и противораковой терапии на разных моделях, учитывающие большее количество факторов.

6. Выводы

1. Получены стабильные клеточные линии MDA-MB-231 и MCF-7 с нокаутом *Nr4a1*, показано снижение устойчивости к доксорубину и цисплатин линии MCF-7 с нокаутом гена *Nr4a1* относительно линии, содержащей неспецифическую интерферирующую РНК. Также продемонстрирована резистентность линии MDA-MB-231 с нокаутом к мРНК гена *Nr4a1* на воздействие цисплатином и гемцитабином.
2. Выявлено увеличение экспрессии генов, кодирующих про-апоптотические белки *Bax*, *Bad* и *Puma*, в клеточной линии MDA-MB-231 с наличием NR4A1 без обработки доксорубином. Показано уменьшение относительной экспрессии *Bax* и *Bad* в клеточной линии MDA-MB-231 с наличием NR4A1 при обработке 1 и 3 мкМ доксорубином в течение 24 ч.
3. Продемонстрировано уменьшение экспрессии генов-маркеров эпителиально-мезенхимального перехода, *SNAIL* и *VIM*, в клеточной линии MCF-7 с нокаутом *Nr4a1*.
4. Показано увеличение количества клеток в G0-G1 фазе клеточного цикла в популяции линии MCF-7 с нокаутом *Nr4a1* при обработке этопозидом.

Список литературы

1. Bandukwala H.S., Rao A. 'Nurr'ishing Treg cells: Nr4a transcription factors control Foxp3 expression // *Nature Immunology*. 2013. Vol. 14, № 3. P. 201–203.
2. Beard J.A., Tenga A., Chen T. The interplay of NR4A receptors and the oncogene–tumor suppressor networks in cancer // *Cellular Signalling*. 2015. Vol. 27, № 2. P. 257–266.
3. Beckerman R., Prives C. Transcriptional Regulation by P53 // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010. Vol. 2, № 8.
4. Bianchini G. et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease // *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2016. Vol. 13, № 11. P. 674–690.
5. Bourhis E. et al. Extracellular signal-regulated kinases (ERK) and protein kinase C (PKC) activities are involved in the modulation of Nur77 and Nor-1 expression by dopaminergic drugs // *Journal of Neurochemistry*. 2008. Vol. 106, № 2. P. 875–888.
6. Bouzas-Rodríguez J. et al. The Nuclear Receptor NR4A1 Induces a Form of Cell Death Dependent on Autophagy in Mammalian Cells // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 10.
7. Cainan B.J. et al. A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection // *Immunity*. 1995. Vol. 3, № 3. P. 273–282.
8. Castillo S.O. et al. Dopamine Biosynthesis Is Selectively Abolished in Substantia Nigra/Ventral Tegmental Area but Not in Hypothalamic Neurons in Mice with Targeted Disruption of the Nurr1 Gene // *Molecular and Cellular Neuroscience*. 1998. Vol. 11, № 1–2. P. 36–46.
9. Chaffer C.L. et al. EMT, cell plasticity and metastasis // *Cancer Metastasis Rev*. 2016. Vol. 35, № 4. P. 645–654.
10. Chao L.C. et al. Insulin Resistance and Altered Systemic Glucose Metabolism in Mice Lacking Nur77 // *Diabetes*. 2009. Vol. 58, № 12. P. 2788–2796.

11. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on // *Nature Protocols*. 2006. Vol. 1, № 2. P. 581–585.
12. Costello P.S. et al. Ternary complex factor SAP-1 is required for Erk-mediated thymocyte positive selection // *Nature Immunology*. 2004. Vol. 5, № 3. P. 289.
13. Dai Y. et al. Inhibition of c-Jun N-terminal Kinase Ameliorates Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage Through Inhibition of a Nur77 Dependent Apoptosis Pathway // *Neurochem Res*. 2014. Vol. 39, № 8. P. 1603–1611.
14. Ehrhardt H. et al. Cell cycle-arrested tumor cells exhibit increased sensitivity towards TRAIL-induced apoptosis // *Cell Death & Disease*. 2013. Vol. 4, № 6. P. e661.
15. Fischer M. Census and evaluation of p53 target genes // *Oncogene*. 2017. Vol. 36, № 28. P. 3943–3956.
16. Gilbert F. et al. Nur77 Gene Knockout Alters Dopamine Neuron Biochemical Activity and Dopamine Turnover // *Biol Psychiatry*. 2006. Vol. 60, № 6. P. 538–547.
17. Gillet J.-P., Gottesman M.M. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer // *Multi-Drug Resistance in Cancer* / ed. Zhou J. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. P. 47–76.
18. Gottesman M.M. Mechanisms of Cancer Drug Resistance // *Annual Review of Medicine*. 2002. Vol. 53, № 1. P. 615–627.
19. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation // *Cell*. 2011. Vol. 144, № 5. P. 646–674.
20. Hanna R.N. et al. The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C⁺ monocytes // *Nature Immunology*. 2011. Vol. 12, № 8. P. 778–785.
21. Hanna R.N. et al. NR4A1 (Nur77) Deletion Polarizes Macrophages Toward an Inflammatory Phenotype and Increases Atherosclerosis // *Circulation Research*. 2012. Vol. 110, № 3. P. 416–427.

22. Hawk J.D., Abel T. The role of NR4A transcription factors in memory formation // *Brain Research Bulletin*. 2011. Vol. 85, № 1–2. P. 21–29.
23. Hedrick E. et al. Nuclear receptor 4A1 as a drug target for breast cancer chemotherapy // *Endocrine-Related Cancer*. 2015. Vol. 22, № 5. P. 831–840.
24. Hedrick E. et al. NR4A1 Antagonists Inhibit β 1-Integrin-Dependent Breast Cancer Cell Migration // *Molecular and Cellular Biology*. 2016. Vol. 36, № 9. P. 1383–1394.
25. Ipseiz N. et al. The Nuclear Receptor Nr4a1 Mediates Anti-Inflammatory Effects of Apoptotic Cells // *The Journal of Immunology*. 2014. Vol. 192, № 10. P. 4852–4858.
26. Koenis D.S. et al. Nuclear Receptor Nur77 Limits the Macrophage Inflammatory Response through Transcriptional Reprogramming of Mitochondrial Metabolism // *Cell Reports*. 2018. Vol. 24, № 8. P. 2127-2140.e7.
27. Kohn K.W., Jackman J., O'Connor P.M. Cell cycle control and cancer chemotherapy // *Journal of Cellular Biochemistry*. 1994. Vol. 54, № 4. P. 440–452.
28. Kurakula K. et al. NR4A nuclear receptors are orphans but not lonesome // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2014. Vol. 1843, № 11. P. 2543–2555.
29. Lee S.-O. et al. Targeting NR4A1 (TR3) in cancer cells and tumors // *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2011. Vol. 15, № 2. P. 195–206.
30. Li H. et al. Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3 // *Science*. 2000. Vol. 289, № 5482. P. 1159–1164.
31. Lin B. et al. Conversion of Bcl-2 from Protector to Killer by Interaction with Nuclear Orphan Receptor Nur77/TR3 // *Cell*. 2004. Vol. 116, № 4. P. 527–540.
32. Malewicz M. et al. Essential role for DNA-PK-mediated phosphorylation of NR4A nuclear orphan receptors in DNA double-strand break repair // *Genes & Development*. 2011. Vol. 25, № 19. P. 2031–2040.

33. Marshall H.T., Djamgoz M.B.A. Immuno-Oncology: Emerging Targets and Combination Therapies // *Front. Oncol.* 2018. Vol. 8.
34. Masuyama N. et al. Akt Inhibits the Orphan Nuclear Receptor Nur77 and T-cell Apoptosis // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 35. P. 32799–32805.
35. Maxwell M.A. et al. Nur77 Regulates Lipolysis in Skeletal Muscle Cells: EVIDENCE FOR CROSS-TALK BETWEEN THE β -ADRENERGIC AND AN ORPHAN NUCLEAR HORMONE RECEPTOR PATHWAY // *Journal of Biological Chemistry.* 2005. Vol. 280, № 13. P. 12573–12584.
36. Maxwell M.A., Muscat G.E.O. The NR4A Subgroup: Immediate Early Response Genes with Pleiotropic Physiological Roles // *Nuclear Receptor Signaling.* 2006. Vol. 4, № 1. P. nrs.04002.
37. McEwan I.J., Kumar R. Preface to Nuclear Receptors: From Structure to the Clinic // *Nuclear Receptors: From Structure to the Clinic.* 2015. P. v–vi.
38. Mitra A., Mishra L., Li S. EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance // *Oncotarget.* 2015. Vol. 6, № 13. P. 10697–10711.
39. Mohan H.M. et al. Molecular Pathways: The Role of NR4A Orphan Nuclear Receptors in Cancer // *Clinical Cancer Research.* 2012. Vol. 18, № 12. P. 3223–3228.
40. Moll U.M., Marchenko N., Zhang X. -k. p 53 and Nur77/TR3 – transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction // *Oncogene.* 2006. Vol. 25, № 34. P. 4725.
41. Mullican S.E., DiSpirito J.R., Lazar M.A. The Orphan Nuclear Receptors at Their 25th Year Reunion // *J Mol Endocrinol.* 2013. Vol. 51, № 3. P. T115–T140.
42. Myers S.A. et al. β -Adrenergic signaling regulates NR4A nuclear receptor and metabolic gene expression in multiple tissues☆// *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2009. Vol. 309, № 1–2. P. 101–108.
43. Negrini S., Gorgoulis V.G., Halazonetis T.D. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer // *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2010. Vol. 11, № 3. P. 220–228.

44. Nowyhed H.N. et al. The Nuclear Receptor Nr4a1 Controls CD8 T Cell Development Through Transcriptional Suppression of Runx3 // *Scientific Reports*. 2015. Vol. 5. P. 9059.
45. Olivier M., Hollstein M., Hainaut P. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010. Vol. 2, № 1.
46. Pawlak A., Strzadala L., Kalas W. Non-genomic effects of the NR4A1/Nur77/TR3/NGFIB orphan nuclear receptor // *Steroids*. 2015. Vol. 95. P. 1–6.
47. Pei L. et al. Induction of NR4A Orphan Nuclear Receptor Expression in Macrophages in Response to Inflammatory Stimuli // *Journal of Biological Chemistry*. 2005. Vol. 280, № 32. P. 29256–29262.
48. Pei L. et al. NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism // *Nature Medicine*. 2006. Vol. 12, № 9. P. 1048–1055.
49. Perdew G.H., Heuvel J.P.V., Peters J.M. Regulation of Gene Expression. Springer Science & Business Media, 2008. 334 p.
50. Pols T.W.H. et al. Nur77 modulates hepatic lipid metabolism through suppression of SREBP1c activity // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008. Vol. 366, № 4. P. 910–916.
51. Rajalin A.-M., Aarnisalo P. Cross-talk between NR4A orphan nuclear receptors and β -catenin signaling pathway in osteoblasts // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2011. Vol. 509, № 1. P. 44–51.
52. Safe S. et al. Minireview: Role Of Orphan Nuclear Receptors in Cancer and Potential as Drug Targets // *Molecular Endocrinology*. 2014. Vol. 28, № 2. P. 157–172.
53. Safe S. et al. Nuclear receptor 4A (NR4A) family – orphans no more // *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2016. Vol. 157. P. 48–60.
54. Sekiya T. et al. Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis // *Nature Immunology*. 2013. Vol. 14, № 3. P. 230–237.

55. Sever R., Glass C.K. Signaling by Nuclear Receptors // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013. Vol. 5, № 3.
56. Shapiro G.I., Harper J.W. Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control // *J Clin Invest.* 1999. Vol. 104, № 12. P. 1645–1653.
57. Tacke R. et al. The transcription factor NR4A1 is essential for the development of a novel macrophage subset in the thymus // *Scientific Reports.* 2015. Vol. 5, № 1.
58. Thompson J., Winoto A. During negative selection, Nur77 family proteins translocate to mitochondria where they associate with Bcl-2 and expose its proapoptotic BH3 domain // *Journal of Experimental Medicine.* 2008. Vol. 205, № 5. P. 1029–1036.
59. Veum V.L. et al. The nuclear receptors NUR77, NURR1 and NOR1 in obesity and during fat loss // *International Journal of Obesity.* 2012. Vol. 36, № 9. P. 1195–1202.
60. Wansa K.D.S.A., Harris J.M., Muscat G.E.O. The Activation Function-1 Domain of Nur77/NR4A1 Mediates Trans-activation, Cell Specificity, and Coactivator Recruitment // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 36. P. 33001–33011.
61. Weinberg R.A. *The biology of cancer.* 2014.
62. Winoto A., Littman D.R. Nuclear Hormone Receptors in T Lymphocytes // *Cell.* 2002. Vol. 109, № 2. P. S57–S66.
63. Wu H. et al. Nuclear receptor NR4A1 is a tumor suppressor down-regulated in triple-negative breast cancer // *Oncotarget.* 2017. Vol. 8, № 33. P. 54364–54377.
64. Zeng H. et al. Orphan nuclear receptor TR3/Nur77 regulates VEGF-A-induced angiogenesis through its transcriptional activity // *The Journal of Experimental Medicine.* 2006. Vol. 203, № 3. P. 719.
65. Zhao Y., Bruemmer D. NR4A Orphan Nuclear Receptors: Transcriptional Regulators of Gene Expression in Metabolism and Vascular Biology // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2010. Vol. 30, № 8. P. 1535–1541.

66. Zhou F. et al. Nuclear receptor NR4A1 promotes breast cancer invasion and metastasis by activating TGF- β signalling // Nature Communications. 2014. Vol. 5, № 1.

67. NR4A orphan receptors and cancer // Nuclear Receptor Signaling. 2011.