DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-66-79

CC BY 4.0

Молекулярные механизмы действия кураксина CBL0137 на клетки рака молочной железы *in vitro*

В.Г. Попова[1, 2], Е.С. Лылова[1], А.Ю. Букина[1–3], К.А. Зимин[4], М.К. Хирин[4], Е.М. Жидкова[1], Е.С. Трапезникова[1, 5], М.Г. Якубовская[1, 2], В.П. Максимова[1], К.И. Кирсанов[1, 2]

[1]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;
[2]ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6;
[3]ФГБУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет»; Россия, 119454 Москва, пр-кт Вернадского, 78;
[4]ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117513 Москва, ул. Островитянова, 1, стр. 6;
[5]ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Кирилл Игоревич Кирсанов *kkirsanov85@yandex.ru*

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) – злокачественные новообразования с различным молекулярным профилем, для которых характерны аберрации в механизмах эпигенетической регуляции транскрипции. Одним из таких нарушений, ассоциированных с неблагоприятным прогнозом, является гиперэкспрессия белков семейства BET, ответственных за взаимодействие транскрипционных факторов и областей, богатых ацетилированными гистонами. Ранее мы выявили способность мультитаргетного эпигенетически активного агента кураксина CBL0137 (CBL) ингибировать экспрессию белков BRD2, BRD3, BRD4 в клетках HeLa TI и белков BRD3, BRD4 в клетках РМЖ.

Цель исследования – анализ молекулярных механизмов действия CBL на клетки РМЖ *in vitro*, включая оценку: 1) его цитотоксичности, 2) влияния на клеточный цикл, 3) способности запускать апоптоз, 4) способности вызывать повреждения ДНК, 5) воздействия на экспрессию генов, вовлеченных в процессы пролиферации, апоптоза и репарации.

Материалы и методы. Цитотоксичность CBL в отношении клеток РМЖ (MCF7, MDA-MB-231, SKBR3) оценивали с помощью МТТ-теста. Влияние агента на клеточный цикл и активацию апоптоза анализировали методом проточной цитометрии. Для анализа повреждения ДНК при действии CBL использовали метод ДНК-комет. Изменение экспрессии генов, ассоциированных с пролиферацией, репарацией и апоптозом, оценивали с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. Концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) на клетках РМЖ при действии CBL0137 составили 1 мкМ при 72-часовой экспозиции, 14–25 мкМ – при 24-часовой. Кураксин CBL (в концентрациях 0,5 и 1 мкМ) вызывал арест клеточного цикла G2/M, а также запускал апоптоз во всех клеточных линиях. При действии 1 мкМ CBL зарегистрировано повышение степени повреждения ДНК в клетках MCF7 и SKBR3, при действии обеих концентраций – в клетках MDA-MB-231. Профиль экспрессии генов, вовлеченных в пролиферацию, также отвечал остановке в G2/M-фазе клеточного цикла. Также при действии CBL происходила активация p53-зависимых генов репарации. Выявлено увеличение экспрессии проапоптотических генов и снижение экспрессии антиапоптотических генов.

Заключение. Кураксин CBL0137 показал различное действие на молекулярные процессы в клетках РМЖ. Мы выявили цитостатический эффект этого соединения, подтвержденный на разных молекулярных уровнях. Полученные данные свидетельствуют о способности CBL ингибировать опухолевые процессы в клетках РМЖ, что делает его потенциальным агентом для комбинационной терапии.

Ключевые слова: кураксин CBL0137, рак молочной железы, повреждение ДНК, пролиферация, репарация, апоптоз

Для цитирования: Попова В.Г., Лылова Е.С., Букина А.Ю. и др. Молекулярные механизмы действия кураксина CBL0137 на клетки рака молочной железы *in vitro*. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(4):66–79.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-66-79

Molecular mechanisms of action of curaxin CBL0137 on breast cancer cells *in vitro*

V.G. Popova[1, 2], E.S. Lylova[1], A.Yu. Bukina[1–3], K.A. Zimin[4], M.K. Khirin[4], E.M. Zhidkova[1], E.S. Trapeznikova[1, 3], M.G. Yakubovskaya[1, 2], V.P. Maksimova[1], K.I. Kirsanov[1, 2]

[1]N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;
[2]Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia;
[3]MIREA – Russian Technological University; 78 Vernadskogo Prospekt, Moscow 119454, Russia;
[4]Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; Bld. 6, 1 Ostrovityanova St., Moscow 117513, Russia;
[5]Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Bld. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

Contacts: Kirill Igorevich Kirsanov *kkirsanov85@yandex.ru*

Introduction. Breast cancer (BC) represents a group of malignant neoplasms with various molecular profiles, which are characterized by aberrations in the mechanisms of epigenetic transcription regulation. One of these disruptions associated with a worse prognosis is the overexpression of the BET protein family, responsible for the interaction of transcription factors with histone-rich acetylated regions. Previously, for the multitargeted epigenetically active agent curaxin CBL0137 (CBL), we have shown the ability to inhibit the expression of BRD2, BRD3, BRD4 proteins in HeLa TI cells and BRD3, BRD4 proteins in BC cells.

Aim. To analyze the molecular mechanisms of CBL0137 action on BC cells *in vitro*, including: 1) assessment of cytotoxicity, 2) analysis of the effect on the cell cycle, 3) assessment of the ability to trigger apoptosis, 4) cause DNA damage, and 5) analyze the effect on the expression of genes involved in proliferation, apoptosis and repair processes.

Materials and methods. The cytotoxicity of CBL on BC cells (MCF7, MDA-MB-231, SKBR3) was assessed using the MTT assay. The effect of the agent on the cell cycle and activation of apoptosis was analyzed by flow cytometry. Analysis of DNA damage under the action of CBL was performed using the comet assay. Changes in the expression of genes associated with proliferation, repair and apoptosis were evaluated using real-time polymerase chain reaction.

Results. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) on BC cells under the action of CBL0137 were 1 μM at 72-hour exposure, 14–25 μM at 24-hour. Curaxin CBL (0.5 and 1 μM) caused G2/M cell cycle arrest, and also triggered apoptosis in all cell lines. Under the action of 1 μM CBL, an increase in the degree of DNA damage in MCF7 and SKBR3 cells was recorded, and under the action of both concentrations in MDA-MB-231 cells. The gene expression profile involved in proliferation also corresponded to the arrest in the G2/M phase of the cell cycle. Also, under the action of CBL, the activation of p53-dependent repair genes occurred. An increase in the expression of pro-apoptotic and a decrease in anti-apoptotic genes was shown.

Conclusion. Curaxin CBL0137 showed differential effects on molecular processes in BC cells. We have identified a cytostatic effect of the compound, confirmed at various molecular levels. The data obtained indicate the ability of CBL0137 to inhibit tumor processes in BC cells, which makes it a potentially interesting agent for combination therapy.

Keywords: curaxin CBL0137, breast cancer, DNA damage, proliferation, repair, apoptosis

For citation: Popova V.G., Lylova E.S., Bukina A.Yu. et al. Molecular mechanisms of action of curaxin CBL0137 on breast cancer cells *in vitro*. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2024;11(4):66–79. (In Russ.).

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-66-79

ВВЕДЕНИЕ

Формирование злокачественных новообразований (ЗНО) представляет собой сложный процесс, запускаемый и поддерживаемый генетическими нарушениями и аберрациями в механизмах эпигенетической регуляции транскрипции. Ключевыми эпигенетическими механизмами развития и прогрессии ЗНО являются метилирование ДНК, ацетилирование и метилирование гистонов. Обратимость, характерная для данных модификаций, привела к поиску и разработке эпигенетических модуляторов, влияющих на активность ферментов, отвечающих за структурное состояние хроматина и его модификации [1].

Одним из ЗНО, в прогрессии которого главную роль играют эпигенетические аберрации, является рак молочной железы (РМЖ) [2], являющийся гетерогенным заболеванием. Выделяют несколько подтипов РМЖ: люминальный А (ER+/PR+/HER2–) (ER – рецептор эстрогена; PR – рецептор прогестерона; HER2 – рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа), люминальный В HER2-положительный (ER+/PR+/HER2+), люминальный В HER2-отрицательный (ER+/PR–/HER2–), нелюминальный HER2-положительный (ER–/PR–/HER2+) и трижды негативный (ER–/PR–/HER2–) [3]. Независимо от подтипа для РМЖ характерны аберрации в механизме ацетилирования гистонов. У пациентов с данной патологией наблюдается значительное снижение уровня ацетильных модификаций в сайтах H3K4, H3K9 и H3K18, которое ассоциируется с худшим прогнозом [4, 5]. Также обнаружено закономерное увеличение экспрессии ферментов гистоновых деацетилаз (HDACs) HDAC1, HDAC2, HDAC3, SIRT1, SIRT7 [6–8] и снижение экспрессии ряда гистоновых ацетилтрансфераз (HATs), таких как Tip60, MYST1 и KAT9 [4, 9, 10]. При этом наблюдается значительная гиперэкспрессия транскрипционных

коактиваторов из группы HAT – CBP и P300, ассоциированная с худшим прогнозом [11]. Также для клеток РМЖ характерно изменение экспрессии белков семейства BET, осуществляющих коактивацию транскрипции посредством взаимодействия с ацетилированными гистонами и различными транскрипционными факторами [12]. Показано, что у пациентов с РМЖ происходит увеличение экспрессии онкогенной изоформы белка BRD4 – BRD4-S. Также продемонстрирована связь между активностью BRD4 и способностью клеток РМЖ к миграции и инвазии [11, 13]. В HER2-положительных опухолях повышенная экспрессия гена *BRD2* ассоциирована с неблагоприятным прогнозом (низкими показателями безрецидивной выживаемости) [14]. Показана способность BRD3 и BRD4 активировать экспрессию *ER* и генов семейства *MYC* [15–17].

Ингибирование активности ферментов классов HDAC, HAT и BET является одним из разрабатываемых подходов к совершенствованию противоопухолевой терапии РМЖ [3]. Ингибиторы HDAC представляют собой единственный класс модуляторов ацетилирования гистонов, одобренных для терапии. Однако клинические испытания препаратов этой группы в основном не показали высокой эффективности при РМЖ. Ингибитор CPI-1 из группы ингибиторов HAT находится на этапе доклинических испытаний. Несколько ингибиторов BET показали высокую эффективность на моделях РМЖ *in vitro* и *in vivo* и в настоящее время проходят клинические исследования [18]. Тем не менее актуальной задачей онкологии остается разработка новых ингибиторов BET, а также поиск агентов среди препаратов, применяемых для терапии других ЗНО или используемых в других областях медицины.

CBL0137 (CBL) – кураксин II поколения, представляющий собой низкомолекулярное ДНК-связывающее соединение из класса карбазолов. Он интеркалирует ДНК с последующей дестабилизацией нуклеосом и ингибированием белкового комплекса FACT (facilitates chromatin transcription). При действии CBL FACT образует стабильный комплекс с хроматином и задерживается в нем, что приводит к ингибированию FACT-зависимой транскрипции, в том числе NF-κB-опосредованной транскрипции (NF-κB – транскрипционный ядерный фактор κ). Кроме того, связывание FACT с хроматином приводит к активации p53 [19]. Кураксин CBL способен подавлять транскрипцию, активированную энхансерами и суперэнхансерами, которая имеет решающее значение для экспрессии онкогенов, например из семейства *MYC* [20]. В то же время при действии CBL происходит активация гена опухолевого супрессора *NOTCH1* [21].

Ранее была показана способность CBL активировать эпигенетически репрессированный ген *GFP* в клетках HeLa TI [22]. Результаты анализа механизмов эпигенетического действия продемонстрировали способность CBL ингибировать экспрессию белков BRD2, BRD3 и BRD4 в клетках HeLa TI, что говорит о его потенциале как ингибиторе BET [23]. Далее было показано, что при 24-часовом действии CBL происходит значительное снижение количества белков BRD3 и BRD4 в клетках РМЖ различных молекулярных подтипов (данные не опубликованы).

Цель исследования – анализ молекулярных механизмов действия CBL на клетки РМЖ *in vitro*, включая оценку: 1) его цитотоксичности, 2) влияния на клеточный цикл, 3) способности запускать апоптоз, 4) способности вызывать повреждения ДНК, 5) воздействия на экспрессию генов, вовлеченных в процессы пролиферации, апоптоза и репарации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Использованы клеточные линии аденокарциномы молочной железы 3 подтипов: люминального А (ER+, PR+, HER2–) (MCF7), трижды негативного (ER–, PR–, HER2–) (MDA-MB-231) и HER2-положительного (ER–, PR–, HER2+) (SKBR3).

Клетки получены из азотного банка Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Клетки MCF7 и MDA-MB-231 культивировали в DMEM с добавлением 4,5 г/л глюкозы («ПанЭко», Россия), 10 % (v/v) термически инактивированной фетальной бычьей сыворотки (FBS; Biosera, Франция), смеси антибиотиков, содержащей пенициллин (50 ЕД/мл), стрептомицин (50 мкг/мл) («ПанЭко», Россия) и 2 мМ L-глутамина («ПанЭко», Россия). Клетки SKBR3 культивировали в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с 10 % (v/v) термически инактивированной FBS (Biosera, Франция), смеси антибиотиков, содержащей пенициллин (50 ЕД/мл), стрептомицин (50 мкг/мл) («ПанЭко», Россия) и 1 мМ L-глутамина («ПанЭко», Россия). Клетки пассировали при соотношении 1:5 каждые 3–4 дня, культивирование проводили в стандартных условиях (37 °C, 5 % CO_2) не дольше 2 мес.

Анализ цитотоксичности CBL. Цитотоксичное влияние CBL на клетки РМЖ определяли с помощью MTT-теста. Клетки MCF7, MDA-MB-231 и SKBR3 высевали в плоскодонные 96-луночные планшеты (SPL Lifescience, Корея) по 5×10^3 клеток на лунку. Через 24 ч их обрабатывали 2-кратными серийными разведениями CBL (конечные концентрации от 0,8 мМ до 0,02 мкМ). Все обработки проводились в трех технических повторах. Клетки инкубировали с CBL в течение 24 и 72 ч (37 °C, 5 % CO_2). После инкубации добавляли MTT-реагент (0,25 мг/мл) (Alfa Aesar, Германия) и инкубировали в течение 4 ч (37 °C, 5 % CO_2). После инкубации среду удаляли и добавляли 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) («ПанЭко», Россия) для растворения кристаллов формазана.

Изменения оптической плотности регистрировали при длине волны 540 нм с помощью спектрофотометра Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, США).

Концентрации IC_{50} определяли с помощью GraphPad Prism 8.3.0 методом нелинейной регрессии. Нетоксичные (ингибирующие на 10 % (IC_{10})) и субтоксичные (ингибирующие на 30 % (IC_{30})) концентрации выбраны по результатам MTT-теста на основании кривых доза–эффект. Эксперимент проводили не менее 5 раз.

Анализ влияния CBL на клеточный цикл. Влияние CBL на клеточный цикл определяли с помощью проточной цитометрии (FACS). Клетки MCF7, MDA-MB-231 и SKBR3 высевали в 24-луночный планшет (SPL Lifescience, Корея) по 20 × 10^3 клеток в лунку. Через 24 ч проводили смену среды и обрабатывали клетки CBL в концентрациях 0,5 мкМ и 1 мкМ, после чего инкубировали в течение 72 ч (37 °C, 5 % CO_2). Конечная концентрация ДМСО в среде составляла не более 0,1%. После инкубации клетки отмывали в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) (1500 об/мин, 5 мин), фиксировали в 70 % этаноле (не менее 2 ч) и окрашивали пропидий йодидом (PI, Invitrogen, США). Распределение клеток по фазам клеточного цикла детектировали на проточном цитометре BD FASC Canto II (США).

Статистическую обработку данных проводили с помощью GraphPad Prism 8.3.0 методом двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA. Эксперимент выполняли в двух технических повторах не менее 5 раз.

Анализ влияния CBL на активацию апоптоза. Влияние CBL на активацию апоптоза в клетках РМЖ определяли с помощью FACS. Клетки MCF7, MDA-MB-231 и SKBR3 высевали в 24-луночный планшет (SPL Lifescience, Корея) по 25 × 10^3 клеток в лунку. Через 24 ч проводили смену среды и обрабатывали CBL в концентрациях 0,5 и 1 мкМ. Конечная концентрация ДМСО в среде составляла не более 0,1 %. Клетки инкубировали с CBL в течение 48 ч (37 °C, 5 % CO_2). Анализ активации апоптоза осуществляли с помощью коммерческого набора для прижизненной покраски клеток FITC-Annexin V и PI (BioLegend, Великобритания) по протоколу производителя. Апоптотические изменения в клетках детектировали на проточном цитометре BD FASC Canto II. В качестве положительного контроля использовали клетки, обработанные 3 % раствором формалина в течение 15 мин при 4 °C.

Статистическую обработку данных проводили с помощью GraphPad Prism 8.3.0 методом двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA. Эксперимент выполняли в двух технических повторах не менее 3 раз.

Анализ повреждения ДНК. Способность CBL вызывать повреждение ДНК анализировали с помощью метода ДНК-комет (Comet assay). Клетки MCF7, MDA-MB-231 и SKBR3 высевали в 24-луночный планшет (SPL Lifescience, Корея) по 70 × 10^3 клеток в лунку. Через 24 ч клетки обрабатывали CBL в концентрациях 0,5 и 1 мкМ. Конечная концентрация ДМСО в среде составляла не более 0,1 %. После 24-часовой инкубации клетки отмывали в PBS (1500 об/мин, 5 мин). Далее осадок клеток ресуспендировали в PBS и добавляли в раствор 4 % легкоплавкой агарозы (1:8 v/v; 37 °C). Смесь наносили на слайд и охлаждали для застывания в темноте в течение 15 мин (4 °C). Далее осуществляли лизис клеток (1 ч, 4 °C) и денатурирующую инкубацию в щелочном растворе (30 мин, 4 °C). Затем проводили электрофорез (30 мин, 1 В/см) в буфере TBE (pH 8,3). Далее клетки фиксировали в 70 % этаноле в течение 5 мин и окрашивали раствором красителя Sybr Gold (Invitrogen, США) с конечной концентрацией 1:10 000. Микропрепараты анализировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Axio Observer (Carl Zeiss, Германия) при ×10. Степень повреждения ДНК определяли по параметру момент хвоста с помощью программы CometScore 2.0. В качестве положительного контроля использовали 0,01 % пероксид водорода (H_2O_2).

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8.3.0. Выбросы в наборах данных определяли с помощью метода Rout (Q = 1 %). Статистически значимые различия относительно контроля выявляли с использованием непараметрического критерия Краскела–Уоллеса.

Анализ влияния CBL на гены, отвечающие за пролиферацию, репарацию и апоптоз. Изменения экспрессии генов в клеточных линиях MCF7, MDA-MB-231 и SKBR3 при действии CBL проводили с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Клетки MCF7, MDA-MB-231 и SKBR3 высевали в 6-луночные планшеты (SPL Lifescience, Корея) по 200 × 10^3 в лунку, затем через 24 ч обрабатывали 0,5 и 1 мкМ CBL. Далее из клеток выделяли РНК с помощью фенол-хлороформной экстракции реактивом ExtraRNA («Евроген», Россия). Для избежания контаминации проб геномной ДНК образцы обрабатывали ДНКазой («Синтол», Россия), затем проводили переосаждение РНК методом фенол-хлороформной экстракции. Синтез комплементарной ДНК осуществляли с помощью коммерческого набора для обратной транскрипции («Евроген», Россия). Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили с помощью прибора CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США).

Для анализа экспрессии генов использовали запатентованную панель праймеров, разработанную в отделе химического канцерогенеза Научно-исследовательского института канцерогенеза Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина в рамках выполнения кластерного проекта № 121120100382-1. Изменения уровней экспрессии матричной РНК (мРНК) исследуемых генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Экспрессию генов интереса нормализовали относительно гена домашнего хозяйства *RPLP0*. Все эксперименты выполнены в трех технических повторах не менее 3 раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитотоксическое действие CBL. С помощью MTT-теста определен профиль токсичности CBL в отношении клеток РМЖ различных подтипов. Концентрации IC_{50} для всех линий находились в микромолярном диапазоне. При экспозиции 72 ч IC_{50} для клеток MCF7 составила 0,98 ± 0,14 мкМ, для клеток MDA-MB-231 – 1,05 ± 0,22, для клеток SKBR3 – 0,91 ± 0,16 мкМ (рис. 1, *а*).

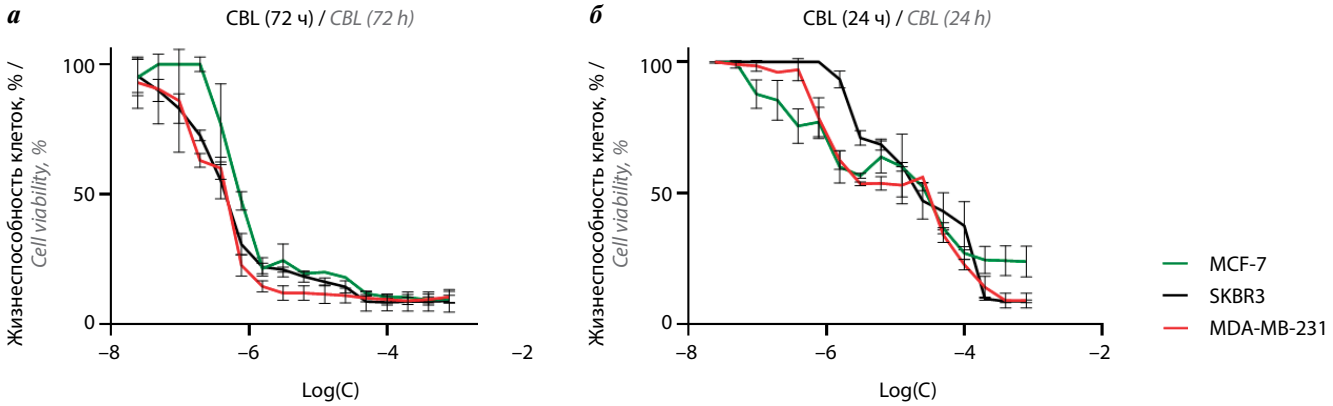


Рис. 1. *Анализ цитотоксического действия CBL на клетки рака молочной железы: а – экспозиция 72 ч; б – экспозиция 24 ч. Результаты MTT-теста. Жизнеспособность клеток представлена как среднее значение ± стандартное отклонение*

Fig. 1. *Analysis of cytotoxic effect of CBL on breast cancer cells: a – 72 h exposure; б – 24 h exposure. Results of the MTT assay. Cell viability is presented as mean ± standard deviation*

При экспозиции 24 ч CBL был менее токсичен: IC_{50} для клеток MCF7 составила 17,6 ± 1,6 мкМ (рис. 1, *б*), для клеток MDA-MB-231 – 14,4 ± 0,96 мкМ, для клеток SKBR3 – 24,7 ± 1,86 мкМ.

Влияние CBL на клеточный цикл. По результатам MTT-теста для каждой линии выбраны нетоксичная (IC_{10}), субтоксичная (IC_{30}) и токсичная (IC_{50}) концентрации CBL при экспозиции 72 ч. В концентрации 0,05 мкМ (IC_{10}) CBL не вызывал изменения распределения клеток MCF7 по фазам клеточного цикла (см. рис. 2, *а, г*).

При действии CBL 0,5 мкМ (IC_{30}) в клетках MCF7 зафиксировано уменьшение количества клеток в фазе G1 с 55,6 (в контроле) до 15,3 и 26,9 % при IC_{30} и IC_{50} соответственно; доля клеток в фазе G2/M увеличилась с 32,5 (в контроле) до 65,9 и 59,7 % при IC_{30} и IC_{50} соответственно. Также стоит отметить статистически значимое увеличение числа клеток в фазе S – с 10,9 до 18,3 % – при действии CBL 0,5 мкМ. После обработки клеток SKBR3 0,2 мкМ CBL не происходило изменений в клеточном цикле (см. рис. 2, *б, г*). В то же время при действии 0,5 и 1 мкМ CBL выявлено снижение доли клеток в фазе G1 с 53,4 (в контроле) до 17,3 и 30,2 % при IC_{30} и IC_{50} соответственно; также наблюдалось увеличение количества клеток в фазе G2/M с 32,5 (в контроле) до 61,7 и 49,5 % при IC_{30} и IC_{50} соответственно. Изменения в количестве клеток в фазе S при действии 0,5 и 1 мкМ CBL не выявлены. В клетках MDA-MB-231 не детектировано изменений в клеточном цикле при действии CBL в нетоксичной концентрации (0,1 мкМ) (см. рис. 2, *в, г*). При этом зарегистрировано уменьшение количества клеток в фазе G1 с 61,9 до 29,6 % при действии CBL в концентрациях 0,5 и 1 мкМ, которое сопровождалось увеличением доли клеток в фазе G2/M с 24,4 (в контроле) до 55,4 и 35,6 % при IC_{30} и IC_{50} соответственно.

Влияние CBL на запуск апоптоза. Проведен анализ активации апоптоза в клетках РМЖ при действии CBL в концентрациях 0,5 и 1 мкМ в течение 48 ч. Клетки MCF7 и SKBR3 имели схожее распределение по стадиям апоптоза. Жизнеспособность клеток MCF7 снизилась с 90,9 до 66,6 % (при обработке 0,5 мкМ CBL) и до 70,3 % (при обработке 1 мкМ CBL), при этом зарегистрировано увеличение количества клеток с поздними апоптотическими изменениями – с 9,8 (в контроле) до 29,4 (при действии 0,5 мкМ CBL) и 25,2 % (при действии 1 мкМ CBL) (рис. 3, *а*).

В клетках SKBR3 зарегистрировано снижение жизнеспособности клеток при действии 0,5 мкМ CBL: доля живых клеток уменьшилась с 92,4 до 69,6 %. При действии 1 мкМ CBL этот показатель снизился до 82,6 %. Доля клеток с поздними апоптотическими изменениями статистически значимо повысилась с 4,3 % в контроле до 25,6 % при действии 0,5 мкМ CBL и до 14,3 % при действии 1 мкМ CBL (рис. 3, *б*). Для MCF7 и SKBR3 повышения доли клеток с ранним апоптозом или некротическими изменениями после обработки CBL детектировано не было.

После обработки клеток MDA-MB-231 0,5 мкМ CBL наблюдали снижение доли жизнеспособных клеток с 89,9 до 24,2 %, после обработки 1 мкМ CBL – до 52,5 % (рис. 3, *в*). Количество клеток с признаками позднего апоптоза увеличилось с 5,7 в контроле до 46,9 % при действии 0,5 мкМ CBL и до 26,1 % при действии 1 мкМ CBL. Также зарегистрировано значимое повышение количества клеток с ранними апоптотическими изменениями: с 4 до 28,7 %

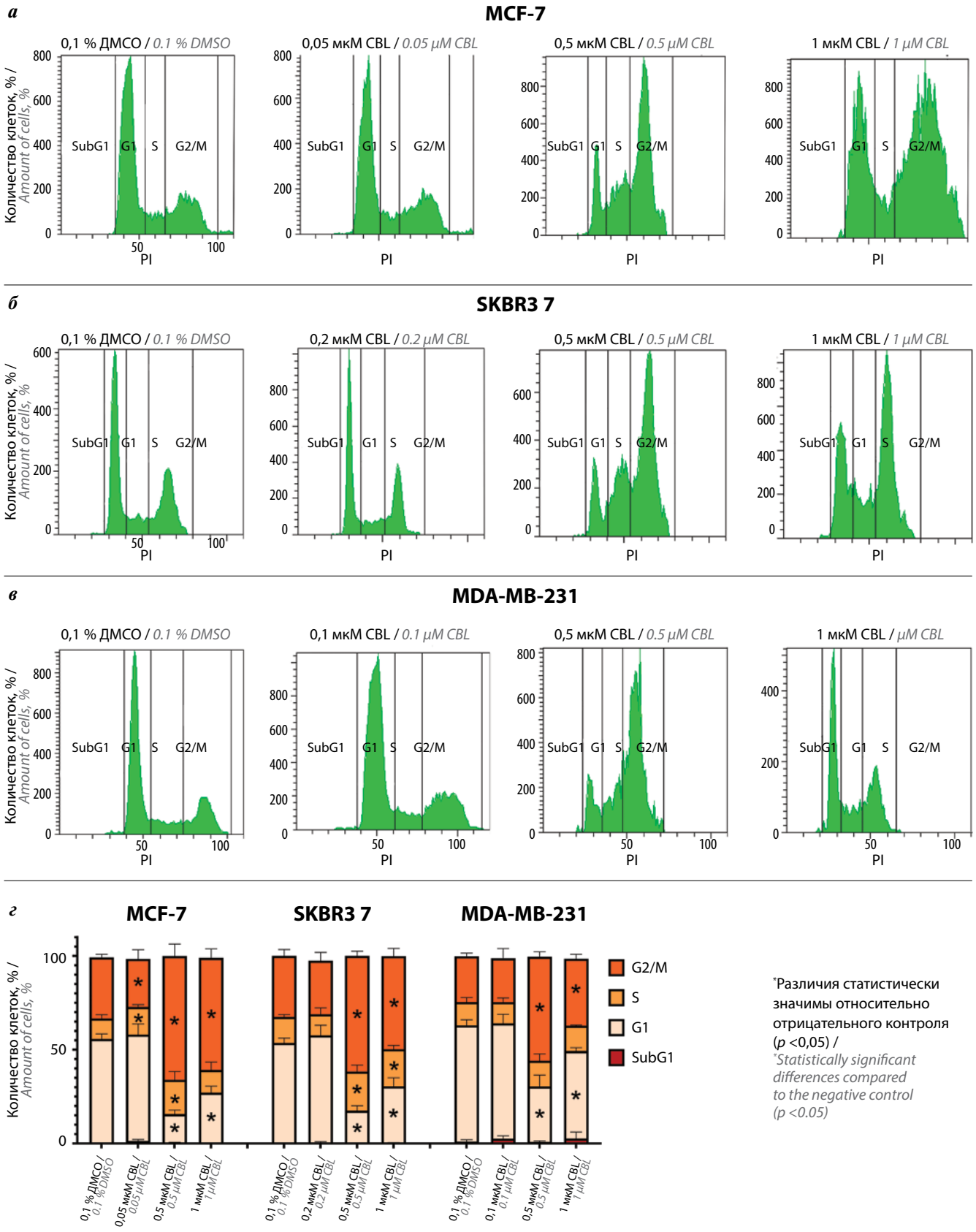
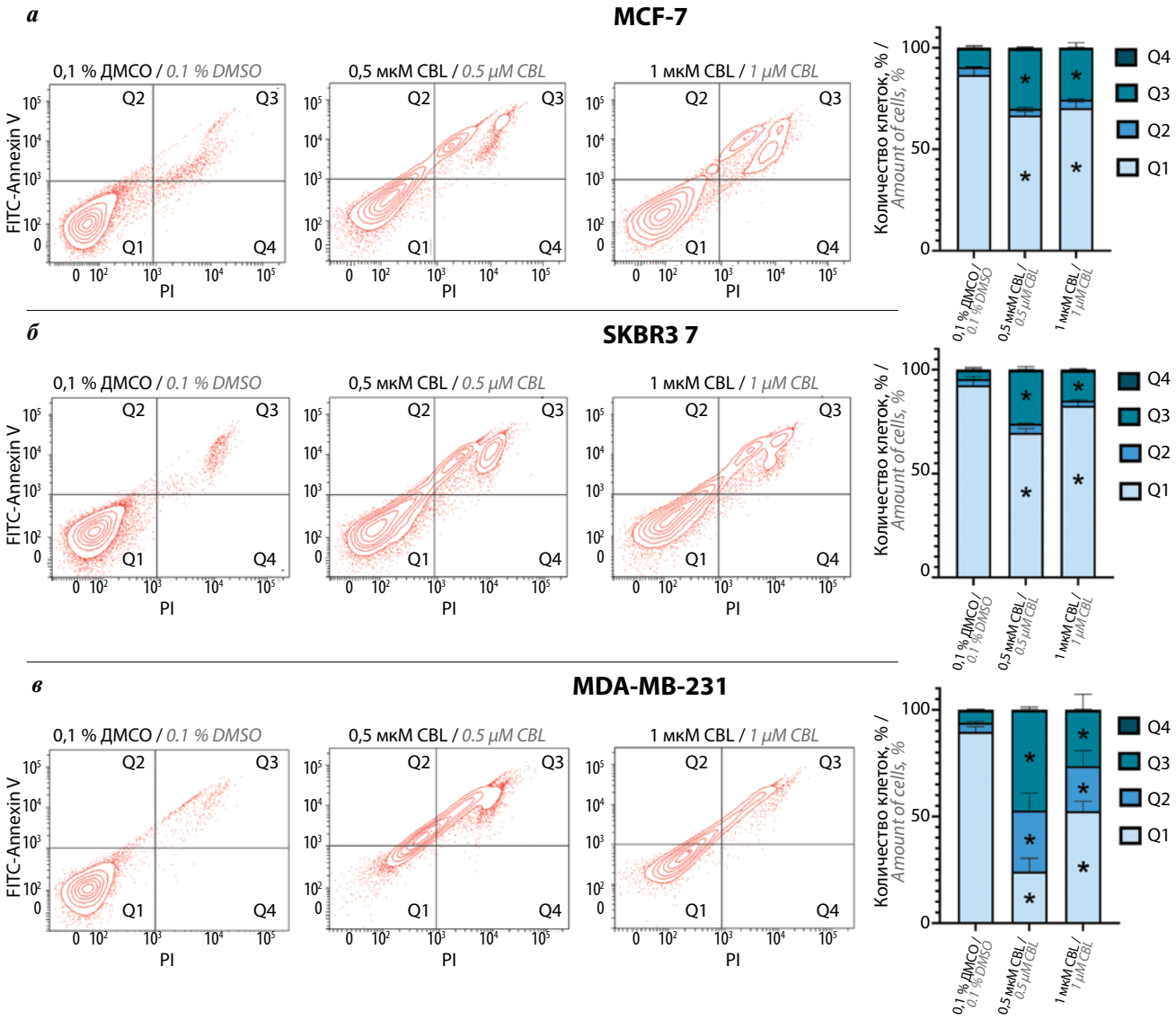


Рис. 2. *Анализ влияния CBL0137 на клеточный цикл клеток рака молочной железы. Результаты проточной цитометрии при экспозиции 72 ч для клеток MCF7 (а), MDA-MB-231 (б) и SKBR3 (в). Распределение клеток по фазам клеточного цикла, представленное как среднее значение ± стандартное отклонение (г). ДМСО – диметилсульфоксид*

Fig. 2. *Analysis of the effect of CBL0137 on the cell cycle of breast cancer cells. Results of flow cytometry after 72 h exposure for MCF7 (a), MDA-MB-231 (б) and SKBR3 (в) cells. Distribution of cells per cell cycle phases presented as mean ± standard deviation (г). DMSO – dimethyl sulfoxide*



*Различия статистически значимы относительно отрицательного контроля (p <0,05) /
*Statistically significant differences compared to the negative control (p <0.05)

Рис. 3. *Анализ влияния CBL на активацию апоптоза в клетках рака молочной железы. Результаты проточной цитометрии при экспозиции 48 ч для клеток MCF7 (а), MDA-MB-231 (б) и SKBR3 (в). Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Q1 – живые клетки; Q2 – ранний апоптоз; Q3 – поздний апоптоз; Q4 – некроз; ДМСО – диметилсульфоксид*

Fig. 3. *Analysis of the effect of CBL on activation of apoptosis in breast cancer cells. Results of flow cytometry after 48 h exposure for MCF7 (a), MDA-MB-231 (б) and SKBR3 (в) cells. Results are presented as mean ± standard deviation. Q1 – living cells; Q2 – early apoptosis; Q3 – late apoptosis; Q4 – necrosis; DMSO – dimethyl sulfoxide*

(при действии 0,5 мкМ CBL) и до 21,1 % (при действии 1 мкМ CBL).

Влияние CBL на повреждение ДНК. Оценку степени повреждения ДНК проводили методом ДНК-комет при действии CBL в концентрациях 0,5 и 1 мкМ в течение 24 ч. В качестве положительного контроля использовали 0,01 % H_2O_2 – сильный окислительный агент, способный вызывать одно- и двунитевые разрывы ДНК. Показано, что при действии 1 мкМ CBL в клетках MCF7 и SKBR3 происходит повышение степени повреждения ДНК. В клетках MCF7 при действии отрицательного контроля (0,01 % ДМСО) медиана момента хвоста составила 0,02 (0,00; 0,14), после их обработки 0,5 мкМ CBL – 0,03 (0,00; 0,30), 1 мкМ CBL – 0,68 (0,01; 3,76) (рис. 4, *а*).

При действии H_2O_2 медиана момента хвоста повысилась до 106,3 (49,9; 134,6). В клетках SKBR3 при действии 0,1 % ДМСО она составила 0,01 (0,00; 0,13), 0,5 мкМ CBL – 0,01 (0,00; 0,13), 1 мкМ CBL – 0,24 (0,00; 2,58) (рис. 4, *б*). После обработки клеток H_2O_2 этот показатель оказался равен 42,76 (29,42; 60,81). В клетках MDA-MB-231 мы наблюдали повышение степени повреждения ДНК при действии 0,5 мкМ и 1 мкМ CBL. После обработки клеток 0,1 % ДМСО

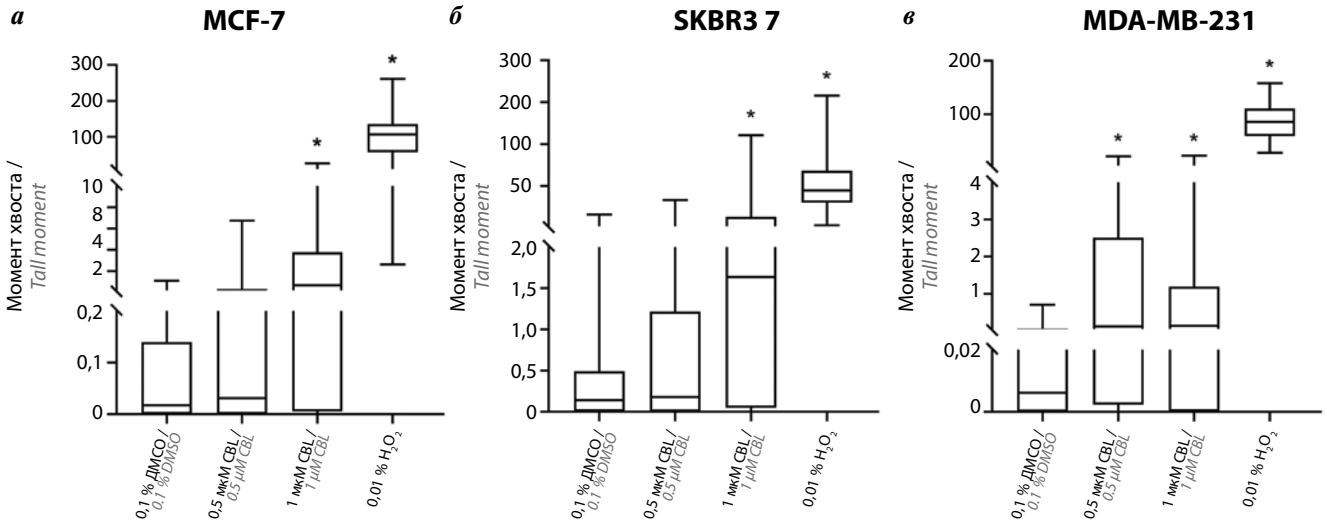


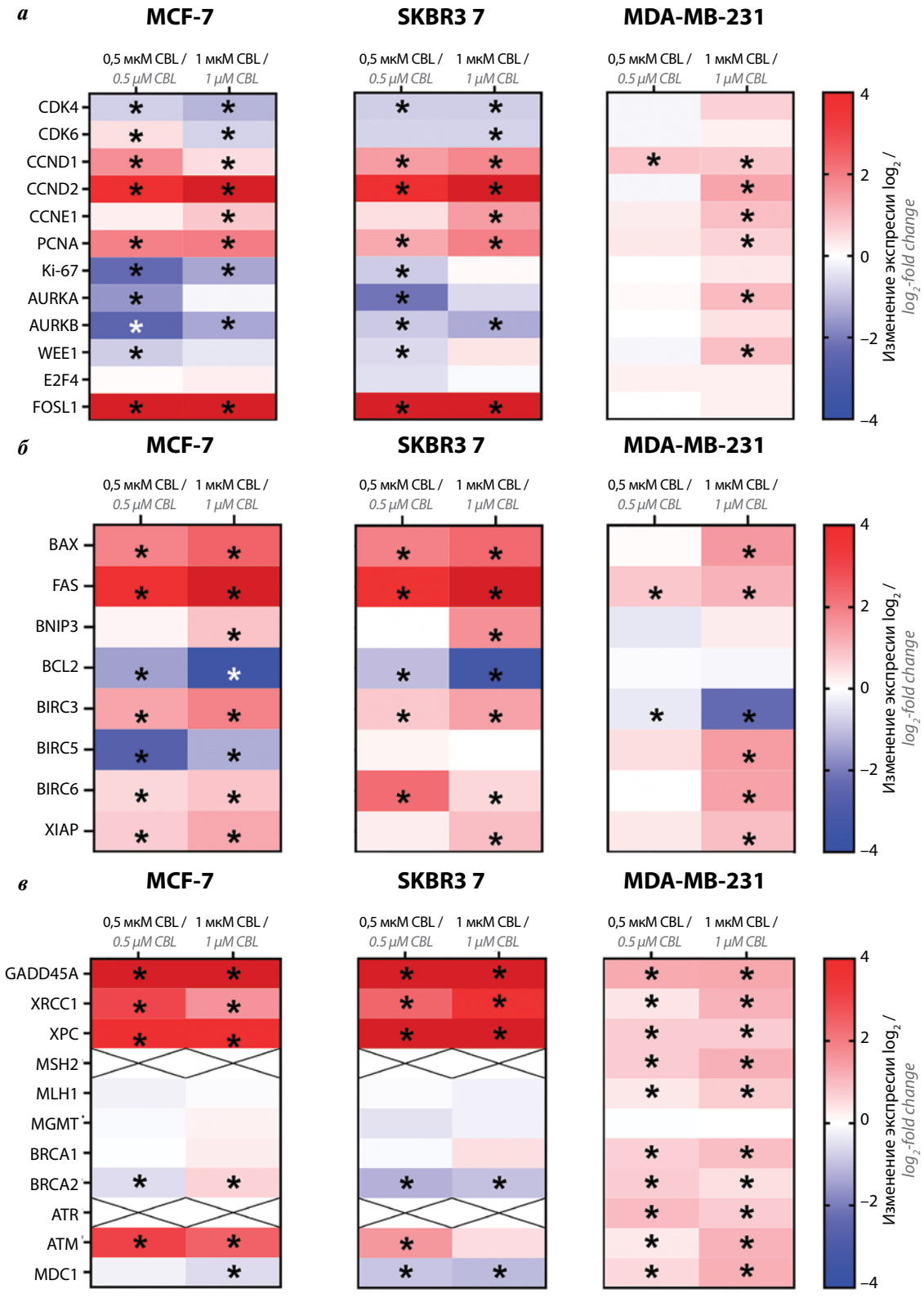
Рис. 4. *Анализ способности CBL вызывать повреждение ДНК. Результаты анализа ДНК-комет при экспозиции 24 ч для клеток MCF7 (а), SKBR3 (б) и MDA-MB-231 (в). Результаты представлены как медиана (25-й квартиль; 75-й квартиль). ДМСО – диметилсульфоксид*
Fig. 4. *Analysis of the capability of CBL to cause DNA damage. Results of DNA comet assay after 24 h exposure for MCF7 (a), SKBR3 (б) and MDA-MB-231 (в). cells. Results are presented as median (25th quartile; 75th quartile). DMSO – dimethyl sulfoxide*

момент хвоста составил 0,01 (0,00; 0,06), 0,5 мкМ и 1 CBL – 0,12 (0,00; 2,5) и 0,14 (0,00; 1,20) соответственно (рис. 4, *в*). Действие H_2O_2 вызвало повышение значения момента хвоста до 85,8 (59,5; 110,7).

Влияние CBL на экспрессию генов пролиферации. Для исследования выбраны гены *CDK4*, *CDK6*, *CCND1* и *CCND2*, ассоциированные с фазой G1 клеточного цикла, гены *CCNE1* и *PCNA*, экспрессирующиеся преимущественно в конце фазы G1 и фазе S клеточного цикла, маркеры делящихся клеток Ki-67, AURKA, AURKB, ген *WEE1*, кодирующий отрицательный регулятор входа в митоз, и гены активаторов транскрипции E2F4 и FOSL1. Для анализа влияния CBL на экспрессию генов пролиферации использовали 2 его концентрации – 0,5 мкМ и 1 мкМ. Наиболее выраженные изменения наблюдали в клеточных линиях MCF7 и SKBR3: при действии даже одной из концентраций происходило изменение экспрессии 11 из 12 генов.

Показано, что при действии CBL в обеих концентрациях на клетки MCF7 и SKBR3 происходит статистически значимое снижение экспрессии гена *CDK4* в 1,7 раза, а также уменьшение экспрессии *CDK6* более чем в 1,5 раза при концентрации CBL 1 мкМ (рис. 5, *а*).

Кураксин CBL в концентрации 0,5 мкМ вызывал небольшое статистически значимое увеличение экспрессии *CDK6* в клетках MCF7 при отсутствии эффекта в клетках SKBR3. После обработки клеток MDA-MB-231 не происходило статистически значимых изменений уровней экспрессии генов *CDK4* и *CDK6*. Для клеток MCF7 и SKBR3 показано, что CBL в обеих концентрациях вызывает усиление экспрессии генов *CCND1* и *CCND2* в 1,5 и 4 раза соответственно. В клетках MDA-MB-231 при действии 0,5 и 1 мкМ CBL зарегистрировано увеличение в 1,5 раза количества мРНК гена *CCND1*, а при действии 0,5 мкМ – 2-кратное повышение экспрессии гена *CCND2*. Кураксин CBL в концентрации 1 мкМ вызывал усиление экспрессии гена *CCNE1* во всех клеточных линиях. Также мы наблюдали повышение в 2 раза экспрессии гена *PCNA* в клетках MCF7 и SKBR3 при действии CBL в обеих концентрациях и в 1,2 раза в клетках MDA-MB-231 при концентрации 1 мкМ. Уровень экспрессии гена *Ki-67*, ассоциированного с фазой G2/M клеточного цикла, статистически значимо снижался при обработке 0,5 и 1 мкМ CBL в MCF7 и 0,5 мкМ в SKBR3. В клетках MDA-MB-231 при действии CBL экспрессия этого гена не менялась. Экспрессия гена *AURKA* снижалась в 2 раза при действии 0,5 мкМ CBL в линиях MCF7 и SKBR3. В то же время после обработки клеток MDA-MB-231 1 мкМ CBL наблюдалось повышение экспрессии гена. Кураксин CBL в концентрациях 0,5 мкМ и 1 мкМ вызывал снижение экспрессии гена *AURKB* в 4 и 2,6 раза соответственно в клетках MCF7, и в 2 раза – в клетках SKBR3. В клетках MDA-MB-231 изменений экспрессии гена *AURKB* зарегистрировано не было. Для гена *WEE1* – отрицательного регулятора входа в митоз – показано статистически значимое снижение количества мРНК в клетках MCF7 и SKBR3 при концентрации CBL 0,5 мкМ, в то время как в клетках MDA-MB-231 происходило 2-кратное повышение экспрессии гена при концентрации CBL 1 мкМ. Экспрессия гена *E2F4* при действии CBL не менялась. Значительное изменение экспрессии под влиянием CBL отмечено для гена-активатора пролиферации *FOSL1*, экспрессия которого



*Различия статистически значимы относительно отрицательного контроля (p <0,05) /
**Statistically significant differences compared to the negative control (p <0.05)*

Рис. 5. *Анализ влияния CBL0137 на экспрессию генов, вовлеченных в процессы пролиферации (а), апоптоза (б) и репарации (в). Результаты полимеразной цепной реакции в реальном времени, нормированные на экспрессию гена RPLP0 и на отрицательный контроль (представлены в виде log_2)*
Fig. 5. *Analysis of the effect of CBL0137 on expression of genes participating in proliferation (а), apoptosis (б) and repair (в). Results of real-time polymerase chain reaction normalized by RPLP0 gene expression and negative control (presented as log_2)*

максимально повышалась в 195 раз в клетках линии MCF7 и в 248 раз – в клетках линии SKBR3. При этом в клетках MDA-MB-231 при действии CBL не происходило изменений экспрессии гена *FOSL1*.

Влияние CBL на экспрессию генов апоптоза. Влияние CBL оценивали по изменению экспрессии проапоптотических (*BAX*, *FAS*, *BNIP3*) и антиапоптотических (*BCL2*, *BIRC3*, *BIRC5*, *BIRC6*, *XIAP*) генов. При действии CBL в концентрациях 0,5 и 1 мкМ в клетках MCF7 происходило увеличение экспрессии гена *BAX* в 3,6 и 5,3 раза соответственно, в клетках SKBR3 – в 4 и 5 раз соответственно (рис. 5, *б*). В клетках MDA-MB-231 зарегистрировано повышение его экспрессии в 2,9 раза только при действии 1 мкМ CBL. После обработки клеток 0,5 и 1 мкМ CBL показано увеличение экспрессии гена *FAS* в клетках MCF7 – в 13 и 28 раз соответственно, в клетках SKBR3 – в 17 и 25 раз соответственно, в клетках MDA-MB-231 – в 1,7 и 2,3 раза соответственно. Экспрессия гена *BNIP3* в клетках MCF7 и SKBR3 при обработке 1 мкМ CBL возрастала более чем в 2 раза. При этом в клетках MDA-MB-231 изменений экспрессии детектировано не было. В клетках MCF7 и SKBR3 при действии 0,5 мкМ CBL экспрессия гена *BCL2* снижалась более чем в 2 раза, при действии 1 мкМ CBL – более чем в 10 раз. В клетках MDA-MB-231 статистически значимого изменения экспрессии *BCL2* не наблюдалось. CBL в концентрациях 0,5 и 1 мкМ вызывал повышение экспрессии *BIRC3* в клетках MCF7 в 2,4 и 4 раза соответственно, в клетках SKBR3 – в 1,7 и 2,4 раза соответственно. Для MDA-MB-231 было выявлено дозозависимое повышение экспрессии гена *BIRC3* – в 1,3 и 4 раза соответственно.

Различные эффекты CBL также показаны для гена *BIRC5*. В клетках MCF7 его экспрессия снижалась более чем в 2,5 раза при действии обеих концентраций CBL, в клетках SKBR3 она не менялась, а для MDA-MB-231 продемонстрировано ее повышение более чем в 2 раза (при концентрации 1 мкМ). В клетках MCF7 и SKBR3 экспрессия гена *BIRC6* повышалась при действии обеих концентраций CBL более чем в 1,5 раза, в клетках MDA-MB-231 при действии 1 мкМ CBL – в 2,4 раза. Также детектировано повышение экспрессии гена *XIAP* более чем в 2 раза во всех клеточных линиях (в MCF7 – при действии обеих концентраций CBL, в SKBR3 и MDA-MB-231 – при действии 1 мкМ CBL).

Влияние CBL на экспрессию генов репарации. Для исследования выбраны гены *GADD45*, *XRCC1* и *XPC*, ассоциированные с эксцизионной репарацией оснований и нуклеотидов, *MLH1*, *MGMT* и *MSH2*, участвующие в мисматч-репарации, *BRCA1* и *BRCA2*, отвечающие за гомологичную рекомбинацию, а также ингибиторы контрольных точек клеточного цикла ATR и MDC1. При действии 0,5 и 1 мкМ экспрессия гена *GADD45* сильно возрастала в клетках MCF7 и SKBR3 – в 127 и 160 раз и в 98 и 265 раз соответственно (рис. 5, *в*). В клетках MDA-MB-231 повышение экспрессии оказалось менее выражено: в 2,4 раза при обеих дозах CBL. Для клеток MCF7 и SKBR3 показано, что при действии обеих концентраций CBL экспрессия гена *XRCC1* возрастала более чем в 3,5 раза, а *XPC* – более чем в 13 раз. Для клеток MDA-MB-231 продемонстрирован статистически значимый рост количества мРНК генов *XRCC1* и *XPC*: в 1,5 раза при действии обеих концентраций CBL.

Конститутивный уровень экспрессии гена *MSH2* в клетках MCF7 и SKBR3 не детектировался. В клетках MDA-MB-231 мы наблюдали 2-кратное увеличение экспрессии гена *MSH2* при действии обеих доз CBL. Экспрессия гена *MLH1* не менялась в клетках MCF7 и SKBR3 и незначительно увеличивалась в клетках MDA-MB-231 при действии обеих концентраций CBL. Экспрессия гена *MGMT* оставалась неизменной после обработки всех клеточных линий. Действие CBL не вызывало статистически значимого изменения экспрессии *BRCA1* в клетках MCF7 и SKBR3, при этом в клетках MDA-MB-231 было зарегистрировано ее повышение более чем в 1,6 раза при обеих концентрациях CBL. Экспрессия *BRCA2* дифференциально менялась при действии CBL в клетках РМЖ. В клетках MCF7 происходило снижение экспрессии в 1,4 раза при действии 0,5 мкМ, при этом CBL в концентрации 1 мкМ вызывал увеличение экспрессии в 1,5 раза.

В клетках SKBR3 при действии обеих доз CBL количество мРНК уменьшалось в 2 раза. Экспрессия гена *BRCA2* в клетках MDA-MB-231 статистически значимо возрастала при обработке CBL – более чем в 1,4 раза. Конститутивная экспрессия гена *ATR* в линиях MCF7 и SKBR3 была недостаточна для детекции. В клетках MDA-MB-231 при действии 0,5 и 1 мкМ CBL экспрессия гена *ATR* возрастала более чем в 1,7 раза. В клетках MCF7 мы наблюдали увеличение экспрессии гена *ATM* более чем в 5 раз при действии обеих концентраций CBL. В клетках SKBR3 она возрастала в 3 раза при действии 0,5 мкМ CBL. Для MDA-MB-231 зарегистрировано повышение экспрессии ATM в 1,3 раза при действии 0,5 мкМ CBL и в 2,5 раза при действии 1 мкМ CBL. Экспрессия гена *MDC1* снижалась более чем в 1,5 раза в клетках MCF7 (при концентрации CBL 1 мкМ) и SKBR3 (при обеих концентрациях CBL). В клетках MDA-MB-231, напротив, наблюдалось увеличение экспрессии этого гена в 1,5 и 2 раза при действии 0,5 и 1 мкМ CBL соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время широко исследуется противоопухолевое действие CBL. В качестве ингибитора FACT он способствует снижению роста и жизнеспособности опухолевых клеток [24–27], а его влияние на такие сигнальные пути, как NOTCH, Hedgehog, NF-kB, p53, и экспрессию *c-MYC* – преодолению резистентности или усилению действия противоопухолевых препаратов на моделях глиобластомы, медуллобластомы, мелко-

клеточного рака легкого, рака поджелудочной железы, В-клеточной неходжкинской лимфомы и серозной карциномы яичников [26, 28–33]. Показано, что CBL повышает эффективность лучевой терапии нейробластомы *in vivo* [29].

В данном исследовании мы изучили механизмы молекулярного действия CBL на клетки РМЖ различных молекулярных подтипов.

Ранее продемонстрированы цитотоксические эффекты CBL на клетках ЗНО различных нозологий, таких как рак яичников, колоректальный рак, лейкоз, множественная миелома и др. [21, 25, 33]. В нашем исследовании мы определили IC_{50}, IC_{30} и IC_{10} CBL для клеток РМЖ MCF7, MDA-MB-231 и SKBR3. Показано, что CBL ингибирует жизнеспособность клеток РМЖ в микромолярном диапазоне концентраций. При 24-часовом действии агента IC_{50} составили 14–25 мкМ, при 72-часовом – около 1 мкМ для всех клеточных линий. Чувствительность клеток РМЖ к CBL0137 была ранее исследована D. Fleyshman и соавт. в контексте цитотоксичности в ответ на ингибирование FACT [34]. Для клеток MCF7 и SKBR3 отмечалась более высокая токсичность CBL, чем для клеток MDA-MB-231, несмотря на сравнимый уровень экспрессии FACT.

На клетках гематологических ЗНО и РМЖ, а также мышиных моделях медуллобластомы показано, что характерным влияниям CBL на клеточный цикл является G2/M-арест с последующими апоптотическими изменениями [25, 35, 36]. Однако в отношении В-клеточной неходжкинской лимфомы сообщалось о дозозависимом увеличении количества клеток в фазе S клеточного цикла, предположительно за счет влияния на путь c-MYC/p53/p21 [26], что также являлось причиной активации апоптоза. Полученные нами данные на клетках MCF7, SKBR3 и MDA-MB-231 показывают, что CBL вызывает арест в фазе G2/M в клетках РМЖ, и согласуются с продемонстрированным профилем действия CBL на другие ЗНО [28, 35]. Кроме того, во всех клеточных линиях мы наблюдали значительное повышение доли клеток с поздними апоптотическими изменениями, а в клетках MDA-MB-231 зарегистрировано увеличение числа клеток с ранним апоптозом. Вероятно, отсутствие значительного увеличения пика SubG1 при действии CBL связано с тем, что клетки РМЖ вступают в апоптоз не в фазе G1, а в фазе G2/M [37]. Это также может быть обусловлено тем, что CBL0137 активирует p53, который способствует транскрипции генов, благоприятствующих остановке G2/M (например, *14-3-3σ*, *Gadd45*), что провоцирует апоптоз [38].

При изучении влияния CBL на экспрессию генов пролиферации мы отметили сходный профиль экспрессии генов для клеток MCF7 и SKBR3.

Наблюдалось снижение экспрессии генов ранней фазы G1 *CDK4* и *CDK6*. Ингибирование их экспрессии, вероятно, происходит из-за продвижения по клеточному циклу, а также вследствие способности CBL подавлять c-MYC и повышать активность p53 [19, 29]. Экспрессия генов циклинов D1, D2 и E1 (*CCND1*, *CCND2* и *CCNE1*), гена *PCNA* и активатора пролиферации *FOSL1*, напротив, возрастала при обработке CBL. Такой эффект был показан впервые. На модели лейкозов и колоректального рака, в свою очередь, наблюдалось снижение экспрессии ряда генов из этой группы [21, 25]. Для полного понимания механизма полученного эффекта необходимо провести дополнительные исследования. Однако сообщалось, что в клетках с амплификацией *TONSL*, таких как MCF7, чрезмерно представлены наборы генов, соответствующие мишеням транскрипционного фактора E2F, среди которых могут быть гены циклинов [39]. Накопление мРНК генов, кодирующих циклины, возможно, связано с тем, что взаимодействие CBL и FACT предотвращает участие FACT в репликации и способствует повреждению ДНК во время фазы S. Это приводит к замедлению роста и клеточной гибели [40].

Анализ профиля экспрессии генов, ассоциированных с фазой G2/M, подтвердил результаты FACS. Мы наблюдали снижение экспрессии генов *Ki-67*, *AURKA*, *AURKB*, влияющих на успешное прохождение фазы G2/M. Ингибирование *Ki-67* на уровне мРНК и белка при действии CBL показано для мышиных клеток медуллобластомы, а также на уровне белка в В-клеточной неходжкинской лимфоме [26, 36]. При обработке CBL клеток MDA-MB-231 мы наблюдали интегральное повышение экспрессии генов пролиферации, не приводящее к активному делению клеток. Возможно, такой эффект осуществлялся за счет повышения доступности хроматина при действии CBL [23, 41, 42].

Мы также оценили экспрессию генов, ассоциированных с апоптозом. Ранее показан проапоптотический эффект CBL в отношении серозной карциномы яичников, глиобластомы и гематологических ЗНО [25–27, 33]. В клетках MDA-MB-231 экспрессия большинства про- и антиапоптотических генов была равномерно повышена, как и в случае с генами пролиферации.

В клетках MCF7 и SKBR3 экспрессия проапоптотических генов *BAX*, *FAS* и *BNIP3* возрастала при действии CBL, что, вероятно, связано с активацией p53. Подобный эффект CBL для BAX на уровне белка продемонстрирован ранее на клетках гепатоцеллюлярной карциномы, рака яичника и В-клеточной неходжкинской лимфомы [26, 33, 43].

В отношении антиапоптотических генов мы наблюдали различные эффекты. Значительное подавление экспрессии при действии CBL показано для антагониста *BAX* – гена *BCL2*, что согласуется с вышеописанными результатами. Ингибирование экспрессии *BCL2* при действии CBL ранее выявлено для ряда клеточных линий лейкозов [25]. Также в клетках MCF7 при действии CBL была понижена экспрессия одного из генов семейства IAP – *BIRC5*, подавляемого p53, в то же время в клетках SKBR3 не отмечено изменения уровня его экспрессии. В литературе нет данных об уровне

экспрессии других членов данного семейства (*BIRC3*, *BIRC6*, *XIAP*) при действии CBL. Мы показали, что CBL повышает экспрессию данных генов в клетках РМЖ.

Мы выявили способность CBL повреждать ДНК в клетках РМЖ. Результаты теста ДНК-комет показали значимое повышение момента хвоста при действии 1 мкМ CBL во всех клеточных линиях и при действии 0,5 мкМ в клетках MDA-MB-231. Несмотря на увеличение степени повреждения ДНК, индекс момента хвоста после обработки клеток CBL не превышал 2, в то время как при действии положительного контроля медианное значение момента хвоста составляло 40 и более. Ранее сообщалось, что CBL не вызывает повреждения ДНК в человеческих и мышиных клетках [42, 44], за исключением клеток глиобластомы [32]. Вероятно, недостаточность систем репарации в клетках РМЖ при обработке CBL приводит к вторичному накоплению повреждений ДНК. Также возможны другие механизмы, обусловленные изменением структуры хроматина или аберрантной экспрессией генов и белков.

Кураксин CBL активно участвует в модуляции различных видов репарации. Так, субъединица комплекса FACT–SSRP1 играет большую роль в восстановлении повреждений ДНК посредством ремоделирования хроматина и взаимодействия с белками PARP и XRCC1. Кроме того, SSRP1 влияет на гомологичную рекомбинацию (homologous recombination, HR) через взаимодействие с ключевым регуляторным белком HR RAD54 [33]. В то же время ингибирование FACT с помощью CBL снижает ацетилирование белка APE1, эндодезоксирибонуклеазы, участвующей в эксцизионной репарации оснований ДНК (base excision repair, BER), что блокирует его функцию [36].

Ранее было показано, что CBL подавляет HR в клетках серозной карциномы яичников [33], а в клетках медуллобластомы препятствует эксцизионной репарации нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER) [36]. Также при действии CBL на клетки РМЖ выявлено изменение экспрессии пула генов, ассоциированных с HR [35].

Мы изучили влияние CBL на экспрессию генов, кодирующих белки репарации в клетках MCF7 и SKBR3, и MDA-MB-231, однако в MDA-MB-231 снова наблюдали интегральное повышение уровня экспрессии генов. Для MCF7 и SKBR3 показано снижение экспрессии гена *BRCA2*, но не *BRCA1*, что в целом может свидетельствовать о подавлении HR аналогично действию CBL на другие ЗНО. Повышение экспрессии генов эксцизионной репарации оснований *XRCC1* и *XPC*, вероятнее всего, ассоциировано с влиянием p53. Кроме того, мы наблюдали значительное повышение экспрессии p53-активируемого гена *GADD45*, ассоциированного с BER и NER, но также способного вызывать G2/M-арест через воздействие на CDC2/CCNB1 и ингибирование киназной активности Aurora-A [45, 46]. Однако экспрессия гена *MDC1,* активатора контрольных точек фаз S и G2/M, индуцируемая повреждением ДНК, снижалась, что, возможно, объясняется подавлением c-MYC при действии CBL. Экспрессия *ATM* – другого гена-активатора контрольных точек – напротив, возрастала, что говорит о повреждении ДНК и возможном аресте клеточного цикла как в фазе G1/S, так и в G2/M. В то же время CBL не влиял на экспрессию генов, ассоциированных с мисматч-репарацией, что было показано впервые. Стоит отметить, что в ряде работ сообщалось о влиянии CBL на клетки через изменение структуры хроматина, без непосредственного повреждения ДНК [41, 42, 44]. Вероятно, способность CBL инициировать разрывы ДНК и влиять на экспрессию генов репарации зависит от типа клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках представленного исследования показано противоопухолевое действие CBL на клетки РМЖ *in vitro*. Кураксин CBL оказывает цитотоксический эффект, вызывает повреждение ДНК, а также запускает G2/M-арест и апоптоз в клетках РМЖ. Влияние CBL на экспрессию генов, ассоциированных с ключевыми процессами опухолевого роста, различается. Интегральное повышение экспрессии генов при действии CBL на клетки MDA-MB-231 показано впервые и является предметом для дальнейших исследований. Изучение влияния CBL на экспрессию генов в MCF7 и SKBR3 позволяет лучше понять, какие сигнальные пути он задействует, что дает возможность оценивать его перспективность как для монотерапии, так и для комбинации с другими агентами в целях усиления противоопухолевого эффекта или преодоления резистентности к терапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Baylin S.B., Jones P.A. Epigenetic determinants of cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol 2016;8(9):a019505. DOI: 10.1101/cshperspect.a019505
2. Prabhu K.S., Sadida H.Q., Kuttikrishnan S. et al. Beyond genetics: Exploring the role of epigenetic alterations in breast cancer. Pathol Res Pract 2024;254:155174. DOI: 10.1016/j.prp.2024.155174
3. Thakur C., Qiu Y., Fu Y. et al. Epigenetics and environment in breast cancer: new paradigms for anti-cancer therapies. Front Oncol 2022;12:971288. DOI: 10.3389/fonc.2022.971288
4. Judes G., Dubois L., Rifai K. et al. TIP60: an actor in acetylation of H3K4 and tumor development in breast cancer. Epigenomics 2018;10(11):1415–30. DOI: 10.2217/epi-2018-0004
5. Paydar P., Asadikaram G., Nejad H.Z. et al. Epigenetic modulation of BRCA-1 and MGMT genes, and histones H4 and H3 are associated with breast tumors. J Cell Biochem 2019;120(8):13726–36. DOI: 10.1002/jcb.28645
6. Muller B.M., Jana L, Kasajima A. et al. Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer-over expression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression. BMC Cancer 2013;13:215. DOI: 10.1186/1471-2407-13-215
7. Rifai K., Judes G., Idrissou M. et al. SIRT1-dependent epigenetic regulation of H3 and H4 histone acetylation in human breast cancer. Oncotarget 2018;9(55):30661–78. DOI: 10.18632/oncotarget.25771
8. Aljada A., Saleh A.M., Alkathiri M. et al. Altered sirtuin 7 expression is associated with early stage breast cancer. Breast Cancer (Auckl) 2015;9:3–8. DOI: 10.4137/BCBCR.S23156
9. Pfister S., Rea S., Taipale M. et al. The histone acetyltransferase hMOF is frequently downregulated in primary breast carcinoma and medulloblastoma and constitutes a biomarker for clinical outcome in medulloblastoma. Int J Cancer 2008;122(6):1207–13. DOI: 10.1002/ijc.23283
10. Wang D., Yang P.N., Chen J. et al. Promoter hypermethylation may be an important mechanism of the transcriptional inactivation of ARRDC3, GATA5, and ELP3 in invasive ductal breast carcinoma. Mol Cell Biochem 2014;396(1–2):67–77. DOI: 10.1007/s11010-014-2143-y
11. Xiao X.S., Cai M.Y., Chen J.W. et al. High expression of p300 in human breast cancer correlates with tumor recurrence and predicts adverse prognosis. Chin J Cancer Res 2011;23(3):201–7. DOI: 10.1007/s11670-011-0201-5
12. Sahni J.M., Keri R.A. Targeting bromodomain and extraterminal proteins in breast cancer. Pharmacol Res 2018;129:156–76. DOI: 10.1016/j.phrs.2017.11.015
13. Wu S.Y., Lee C.F., Lai H.T. et al. Opposing functions of BRD4 isoforms in breast cancer. Mol Cell 2020;78(6):1114–32:e10. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.04.034
14. Perez-Pena J., Paez R., Nieto-Jimenez C. et al. Mapping Bromodomains in breast cancer and association with clinical outcome. Sci Rep 2019; 9(1):5734. DOI: 10.1038/s41598-019-41934-3
15. Zheng Z.Z., Xia L., Hu G.S. et al. Super-enhancer-controlled positive feedback loop BRD4/ERalpha-RET-ERalpha promotes ERalpha-positive breast cancer. Nucleic Acids Res 2022;50(18):10230–48. DOI: 10.1093/nar/gkac778
16. Murakami S., Li R., Nagari A. et al. Distinct roles for BET family members in estrogen receptor alpha enhancer function and gene regulation in breast cancer cells. Mol Cancer Res 2019;17(12):2356–68. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-19-0393
17. Andrikopoulou A., Liontos M., Koutsoukos K. et al.The emerging role of BET inhibitors in breast cancer. Breast 2020;53:152–63. DOI: 10.1016/j.breast.2020.08.005
18. Ren L., Yang Y., Li W. et al. Recent advances in epigenetic anticancer therapeutics and future perspectives. Front Genet 2022;13:1085391. DOI: 10.3389/fgene.2022.1085391
19. Gasparian A.V., Burkhart C.A., Purmal A.A. et al. Curaxins: anticancer compounds that simultaneously suppress NF-kappaB and activate p53 by targeting FACT. Sci Transl Med 2011;3(95):95ra74. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002530
20. Kantidze O.L., Luzhin A.V., Nizovtseva E.V. et al. The anti-cancer drugs curaxins target spatial genome organization. Nat Commun 2019;10(1):1441. DOI: 10.1038/s41467-019-09500-7
21. Kirsanov K., Fetisov T., Lesovaya E.A. et al. Prevention of colorectal carcinogenesis by dna-binding small-molecule curaxin CBL0137 involves suppression of wnt signaling. Cancer Prev Res (Phila) 2020;13(1):53–64. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-19-0198
22. Leonova K., Safina A., Nesher E. et al. TRAIN (transcription of repeats activates interferon) in response to chromatin destabilization induced by small molecules in mammalian cells. Elife 2018;7:e.30842. DOI: 10.7554/eLife.30842
23. Maksimova V., Popova V., Prus A. et al. Insights into the mechanism of curaxin CBL0137 epigenetic activity: the induction of DNA demethylation and the suppression of BET family proteins. Int J Mol Sci 2023;24(16):12874. DOI: 10.3390/ijms241612874
24. Jin M.Z., Xia B.R., Xu Y., Jin W.L. Curaxin CBL0137 exerts anticancer activity via diverse mechanisms. Front Oncol 2018;8:598. DOI: 10.3389/fonc.2018.00598
25. Fetisov T.I., Borunova A.A., Antipova A.S. et al. Targeting features of curaxin CBL0137 on hematological malignancies *in vitro* and *in vivo*. Biomedicines 2023;11(1):230. DOI: 10.3390/biomedicines11010230
26. Lv Y., Du Y., Li K. et al. The FACT-targeted drug CBL0137 enhances the effects of rituximab to inhibit B-cell non-Hodgkin's lymphoma tumor growth by promoting apoptosis and autophagy. Cell Commun Signal 2023;21(1):16. DOI: 10.1186/s12964-022-01031-x
27. Barone T.A., Burkhart C.A., Safina A. et al. Anticancer drug candidate CBL0137, which inhibits histone chaperone FACT, is efficacious in preclinical orthotopic models of temozolomide-responsive and resistant glioblastoma. Neuro Oncol 2017;19(2):186–96. DOI: 10.1093/neuonc/now141
28. Mo J., Liu F., Sun X. et al. Inhibition of the FACT complex targets aberrant hedgehog signaling and overcomes resistance to smoothened antagonists. Cancer Res 2021;81(11):3105–20. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-20-3186
29. Carter D.R., Murray J., Cheung B.B. et al. Therapeutic targeting of the MYC signal by inhibition of histone chaperone FACT in neuroblastoma. Sci Transl Med 2015;7(312):312ra176. DOI: 10.1126/scitranslmed.aab1803
30. De S., Lindner D.J., Coleman C.J. et al.The FACT inhibitor CBL0137 synergizes with cisplatin in small-cell lung cancer by increasing NOTCH1 expression and targeting tumor-initiating cells. Cancer Res 2018;78(9):2396–406. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1920
31. Burkhart C., Fleyshman D., Kohrn R. et al. Curaxin CBL0137 eradicates drug resistant cancer stem cells and potentiates efficacy of gemcitabine in preclinical models of pancreatic cancer. Oncotarget 2014;5(22):11038–53. DOI: 10.18632/oncotarget.2701
32. Tallman M.M., Zalenski A.A., Deighen A.M. et al. The small molecule drug CBL0137 increases the level of DNA damage and the efficacy of radiotherapy for glioblastoma. Cancer Lett 2021;499:232–42. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.11.027
33. Lu X., He Y., Johnston R.L. et al. CBL0137 impairs homologous recombination repair and sensitizes high-grade serous ovarian carcinoma to PARP inhibitors. J Exp Clin Cancer Res 2022;41(1):355. DOI: 10.1186/s13046-022-02570-4
34. Fleyshman D., Prendergast L., Safina A. et al. Level of FACT defines the transcriptional landscape and aggressive phenotype of breast cancer cells. Oncotarget 2017;8(13):20525–42. DOI: 10.18632/oncotarget.15656

35. Khatpe A.S., Dirks R., Bhat-Nakshatri P. et al. TONSL Is an immortalizing oncogene and a therapeutic target in breast cancer. Cancer Res 2023;83(8):1345–60. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-22-3667
36. Song H., Xi S., Chen Y. et al. Histone chaperone FACT complex inhibitor CBL0137 interferes with DNA damage repair and enhances sensitivity of medulloblastoma to chemotherapy and radiation. Cancer Lett 2021;520:201–12. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.07.020
37. Plesca D., Mazumder S., Almasan A. DNA damage response and apoptosis. Methods Enzymol 2008;446:107–22. DOI: 10.1016/S0076-6879(08)01606-6
38. Klug W.S., Cummings M.R., Spencer C.A., Palladino M.A. Concepts of genetics. 10 edn. Pearson, 2011.
39. Espinoza J.A., Kanellis D.C., Saproo S. et al. Chromatin damage generated by DNA intercalators leads to degradation of RNA Polymerase II. Nucleic Acids Res 2024;52(8):4151–66. DOI: 10.1093/nar/gkae069
40. Prendergast L., Hong E., Safina A. et al. Histone chaperone FACT is essential to overcome replication stress in mammalian cells. Oncogene 2020;39(28):5124–37. DOI: 10.1038/s41388-020-1346-9
41. Volokh O.I., Sivkina A.L., Moiseenko A.V. et al. Mechanism of curaxin-dependent nucleosome unfolding by FACT. Front Mol Biosci 2022;9:1048117. DOI: 10.3389/fmolb.2022.1048117
42. Nesher E., Safina A., Aljahdali I. et al. Role of Chromatin damage and chromatin trapping of FACT in mediating the anticancer cytotoxicity of DNA-binding small-molecule drugs. Cancer Res 2018;78(6):1431–43. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2690
43. Albahde M.A.H., Zhang P., Chen H., Wang W. CBL0137 administration suppresses human hepatocellular carcinoma cells proliferation and induces apoptosis associated with multiple cell death related proteins. Neoplasma 2020;67(3):547–56. DOI: 10.4149/neo_2020_190621N535
44. Luzhin A., Rajan P., Safina A. et al. Comparison of cell response to chromatin and DNA damage. Nucleic Acids Res 2023;51(21):11836–55. DOI: 10.1093/nar/gkad865
45. Salvador J.M., Brown-Clay J.D., Fornace A.J. Jr. Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis. Adv Exp Med Biol 2013;793:1–19. DOI: 10.1007/978-1-4614-8289-5_1
46. Shao S., Wang Y., Jin S. et al. Gadd45a interacts with aurora-A and inhibits its kinase activity. J Biol Chem 2006;281(39):28943–50. DOI: 10.1074/jbc.M600235200

Вклад авторов
В.Г. Попова, Е.С. Лылова: получение и анализ данных, написание текста статьи, подготовка иллюстраций (внесли равный вклад);
А.Ю. Букина, К.А. Зимин, М.К. Хирин, Е.М. Жидкова, Е.С. Трапезникова: получение данных для анализа;
М.Г. Якубовская: анализ полученных данных, редактирование;
В.П. Максимова, К.И. Кирсанов: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, подготовка иллюстраций, редактирование (внесли равный вклад).
Authors' contributions
V.G. Popova, E.S. Lylova: obtaining and analyzing data, article writing, preparing illustrations (made an equal contributions);
A.Yu. Bukina, K.A. Zimin, M.K. Khirin, E.M. Zhidkova, E.S. Trapeznikova: obtaining data for analysis;
M.G. Yakubovskaya: analysis of the received data, editing;
V.P. Maksimova, K.I. Kirsanov: research design development, data analysis, illustration preparation, editing (made an equal contributions).

ORCID авторов / ORCID authors
В.Г. Попова / V.G. Popova: https://orcid.org/0000-0002-7301-605X
Л.С. Лылова / E.S. Lylova: https://orcid.org/0000-0001-6388-1624
А.Ю. Букина / A.Yu. Bukina: https://orcid.org/0000-0002-0963-3432
К.А. Зимин / K.A. Zimin: https://orcid.org/0009-0008-7714-114X
М.К. Хирин / M.K. Khirin: https://orcid.org/0009-0008-1533-5184
Е.М. Жидкова / E.M. Zhidkova: https://orcid.org/0000-0003-3318-9391
Е.С. Трапезникова / E.S. Trapeznikova: https://orcid.org/0000-0003-1274-4667
М.Г. Якубовская / M.G. Yakubovskaya: https://orcid.org/0000-0002-9710-8178
В.П. Максимова / V.P. Maksimova: https://orcid.org/0000-0003-0896-2952
К.И. Кирсанов / K.I. Kirsanov: https://orcid.org/0000-0002-8599-6833

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-75-10163).
Funding. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (project No. 21-75-10163).

Статья поступила: 13.05.2024. **Принята к публикации:** 01.11.2024. **Опубликована онлайн:** 11.12.2024.
Article submitted: 13.05.2024. **Accepted for publication:** 01.11.2024. **Published online:** 11.12.2024.