БИОХИМИЯ, 2021, том 86, вып. 11, с. 1702 – 1718

УДК 577.175.6

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ СЕЛЕКТИВНЫХ ЛИГАНДОВ МЕМБРАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ ПРОГЕСТЕРОНА В КЛЕТКАХ BxPC3 АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2021 А.И. Гончаров[1], И.С. Левина[2], В.Л. Шляпина[1], И.А. Морозов[3], П.М. Рубцов[3], И.В. Заварзин[2], О.В. Смирнова[1], Т.А. Щелкунова[1]*

[1] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: schelkunova-t@mail.ru*

[2] *Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского, 119991 Москва, Россия*

[3] *Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта, 119991 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 31.08.2021
После доработки 23.09.2021
Принята к публикации 23.09.2021

Прогестерон и его синтетические аналоги оказывают свое действие на клетки через разные типы рецепторов, влияя на процессы пролиферации и апоптоза. Они действуют через ядерные рецепторы и малоизученные мембранные рецепторы (mPRs) семейства адипонектиновых и прогестиновых рецепторов (PAQR). Нами были выявлены два селективных лиганда mPRs, активирующие избирательно только этот тип рецепторов – 19-гидроксипрегн-4-ен-20-он (LS-01) и 19-гидрокси-5β-прегн-3-ен-20-он (LS-02). Главной целью этой работы было исследование их действия на процессы пролиферации и гибели опухолевых клеток BxPC3 аденокарциномы поджелудочной железы человека, а также изучение участия двух киназ, p38 MAPK и JNK, в сигнальных каскадах, активируемых прогестинами через mPRs. Показано, что прогестерон и соединение LS-01 достоверно ($p < 0,05$) снижают жизнеспособность клеток BxPC3, при этом посредником их действия является JNK. Выявлены мишени этих двух стероидов – ими являются гены, кодирующие белки Ki67, циклина D1, PCNA и p21. Установлено, что прогестерон и соединение LS-01 достоверно ($p < 0,05$) стимулируют процесс фрагментации ДНК, приводя к усилению гибели клеток. Главным посредником в этом является p38 MAPK. Выявленной мишенью для обоих стероидов является ген, кодирующий белок BCL2A1. Соединение LS-02 оказывает достоверное действие ($p < 0,05$) на проницаемость мембран и экспонирование на наружной мембране фосфатидилсерина, что также приводит к усилению гибели клеток. Показано, что посредниками этого действия являются обе киназы – JNK и p38 MAPK. Мишенью соединения LS-02 являются гены, кодирующие белки HRK, каспазу 9 и DAPK.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: прогестерон, селективные лиганды, пролиферация, апоптоз, экспрессия, ядерный рецептор, мембранные рецепторы прогестерона.

DOI: 10.31857/S0320972521110087

ВВЕДЕНИЕ

Прогестерон (прегн-4-ен-3,20-дион, P4) оказывает разнонаправленное действие на пролиферацию и апоптотическую гибель клеток в зависимости от их фенотипа и рецепторного состава. Как все стероидные гормоны, он может действовать через свои ядерные рецепторы, являющиеся транскрипционными факторами, активируемыми лигандами (nPRs). Также P4 может оказывать эффекты через обнаруженные значительно позднее мембранные рецепторы (mPRs), относящиеся к семейству PAQR-адипонектиновых и прогестиновых рецепторов пяти субтипов [1–2]. Действуя на разные типы клеток, P4 и его синтетические аналоги способны как стимулировать пролиферативные процессы, так и наоборот, подавлять их [3]. Такие же разнонаправленные эффекты эти стероиды имеют на выживаемость опухолевых клеток [4]. Роль мембранных рецепторов в этих процессах мало изучена. Исследование их функции затруднено тем, что эти рецепторы часто локализуются в тех же клетках, что и nPRs. Экспрессия mPRs наб-

Принятые сокращения: циклин D1 – активатор циклин-зависимых протеинкиназ; DAPK – протеинкиназа 1, ассоциированная со смертью (Death-associated protein kinase 1); FAS – Fas-рецептор или апоптозный антиген 1 (Fas cell surface death receptor); GPCRs – рецепторы, сопряженные с G-белками (G protein coupled receptors); HRK – белок, взаимодействующий с BCL2 (Harakiri); Ki67 – маркер пролиферации; mPRs – мембранные рецепторы прогестерона; nPRs – ядерные рецепторы прогестерона; PCNA – ядерный антиген пролиферирующих клеток; P4 – прогестерон; p21 – ингибитор 1A циклин-зависимой киназы; p27 – ингибитор 1B циклин-зависимой киназы.

* Адресат для корреспонденции.

людается как в нормальных тканях, так и в раковых клетках. Исследования показывают, что прогестины через mPRs стимулируют процесс канцерогенеза в одних линиях клеток рака молочной железы [5–7], но ингибируют пролиферацию и метастазирование других линий клеток этого органа [8–9]. Прогестины способствуют миграции, инвазии и пролиферативной активности клеток глиобластомы человека через mPRα [10], но ингибируют процесс канцерогенеза в опухолевых клетках рака яичников и легких – также через активацию mPRs [11, 12]. Таким образом, через эти рецепторы P4 влияет на процессы, которые играют, по-видимому, важную роль в прогрессии опухолей.

Ранее в нашей работе было показано, что P4 ингибирует пролиферацию клеток BxPC3 аденокарциномы поджелудочной железы человека, действуя через свои мембранные рецепторы [13]. Экспрессии генов классических ядерных рецепторов прогестерона в этих клетках обнаружено не было, в то время как экспрессия генов mPRs, преимущественно субтипов α и γ, наблюдалась на самом высоком уровне среди 16 изученных линий опухолевых клеток человека, достигая 270–283% от уровня мРНК GAPDH. Изучение белкового состава рецепторов прогестерона методом вестерн-блоттинга подтвердило эти выводы [13]. Самая низкая экспрессия mPRs наблюдалась в клеточной линии LNCaP аденокарциномы простаты, где уровни мРНК mPRs субтипов α, β и γ не превышали 2% от уровня GAPDH, причем мРНК nPRs в них также не была обнаружена [13]. Максимальный эффект подавления пролиферативной активности клеток BxPC3 прогестероном наблюдался через 72 ч инкубации с гормоном. При изучении лигандной специфичности сродства серии синтезированных прогестинов к mPRs в сравнении с классическими рецепторами прогестерона нами были выявлены два селективных лиганда мембранных рецепторов, практически не взаимодействующие с nPRs. Соединения 19-гидроксипрегн-4-ен-20-он (LS-01) и 19-гидрокси-5β-прегн-3-ен-20-он (LS-02), формулы которых опубликованы ранее [14, 15], имеют относительную конкурентную активность по отношению к mPRs, равную в среднем 10% и 24% от активности прогестерона соответственно [14, 15]. Эффекты селективных лигандов mPRs были изучены в иммунных клетках [16]. В данной работе мы исследовали действие этих соединений на пролиферацию и гибель опухолевых клеток BxPC3 в сравнении с эффектами P4, а также участие p38 MAPK и JNK в этих процессах.

Как было показано в ряде работ, посредниками действия P4 при активации mPRs могут быть разные сигнальные каскады: ERK1/2 (p42/44 MAPK) [2, 5, 17–19], стимуляция PI3K/Akt [5–7, 10, 18–20], подавление активности той же PI3K/Akt [21, 22], p38 MAPK [11, 23, 24], JNK1/2 [11, 23], Src [8, 10], MEK1/2 и PKA [25], TGFβ1 [26] и другие [8, 22]. При активации ERK1/2 и PI3K/Akt наблюдалось, как правило, усиление пролиферации клеток и ингибирование их гибели. Противоположный эффект проявлялся при активации через mPRs сигнального каскада p38 MAPK и JNK1/2 [11, 23]. Поскольку прогестерон путем действия через эти рецепторы оказывал антипролиферативный эффект на клетки BxPC3, мы исследовали роль p38 MAPK и JNK в сигнальных путях, активируемых при взаимодействии гормонов с mPRs. Для этого мы использовали ингибиторы SB203580 и SP600125, блокирующие работу этих двух ферментов, и оценивали фосфорилирование последних при обработке клеток P4 и селективными лигандами mPRs – LS-01 и LS-02.

При изучении механизма действия mPRs важную роль играет топология этих белков, особенно расположение *C*-концевого участка рецепторов по отношению к мембране. Существуют данные, позволяющие отнести mPRs к семейству рецепторов, связанных с G-белками, характеризующимися внутриклеточным расположением *C*-концевого участка [24, 27, 28]. Тем не менее с использованием биоинформатических алгоритмов было предсказано, что *C*-конец мембранных рецепторов прогестерона расположен вне клетки [29], что в дальнейшем было показано экспериментально для одного из субтипов mPRs [30]. Поскольку топология изучаемых белков является предметом разногласий [17, 27, 31], мы изучили взаимодействие клеток BxPC3 с антителами к внутреннему и *C*-концевому участку mPRs трех субтипов для дополнительного подтверждения экспрессии белков и определения локализации их *C*-доменов.

Связывание P4 с mPRs имеет сродство примерно в 5–30 раз более низкое по сравнению с nPRs [13, 14, 27]. Считается, что через эти рецепторы прогестерон действует в высоких физиологических концентрациях, наблюдаемых при беременности или локально – в местах синтеза этого стероида. Поэтому в работе мы использовали высокие физиологические и фармакологические концентрации прогестинов, от 1 до 20 мкМ, для наилучшего выявления эффектов, опосредуемых мембранными рецепторами. Показано, что P4 в концентрациях 20–80 мкМ не влиял на жизнеспособность здоровых фибробластов человека и клеток первичной культуры кортикальных нейронов крысы [32, 33]. Кроме того, подобные концентрации прогестерона

наблюдались в сыворотке животных при его введении, при этом они не страдали от токсических эффектов, которые оценивали по выживаемости, активности животных и изменению массы тела [32].

Таким образом, главной целью этой работы было изучение действия селективных лигандов mPRs LS-01 и LS-02 в сравнении с эффектами P4 на пролиферацию и апоптотическую гибель клеток BxPC3 аденокарциномы поджелудочной железы человека с высоким содержанием мембранных рецепторов. Для этого мы исследовали:

1) наличие белков mPRs в этих клетках методом, отличным от использованного нами ранее [13];

2) влияние P4, LS-01 и LS-02 на: а) жизнеспособность клеток BxPC3 с использованием клеток LNCaP в качестве негативного контроля; б) фрагментацию ядерной ДНК, экспонирование фосфатидилсерина на наружной мембране клеток и проницаемость мембран клеток для йодистого пропидия; в) экспрессию генов факторов, связанных с пролиферацией и процессами апоптоза;

3) влияние P4, LS-01 и LS-02 на активирующее фосфорилирование p38 MAPK и JNK. Эксперименты проводили в отсутствие и в присутствии ингибиторов p38 MAPK и JNK для исследования роли последних в опосредовании эффектов P4 и селективных лигандов mPRs на изучаемые процессы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Все реактивы, среды и сыворотки были произведены компаниями «HyClone» (США), «Gibco» (США), «ПанЭко» (РФ), «Sigma-Aldrich» (США), «Invitrogen» (США), «Promega» (США), «Синтол» (РФ), «Biological Industries» (США), «Thermo Scientific» (США), «GE Healthcare» (Великобритания), «SelleckChem» (США). В работе были использованы следующие антитела: ab75508, ab123693, ab79517, goat anti-rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 488) ab150077 «Abcam» (США), Phospho-p38 MAPK (Thr180, Tyr182) S.417.1 «Invitrogen», Anti-JNK antibody SAB4200176, monoclonal anti-JNK, activated (diphosphorylated JNK) J4750, Anti-p38 MAPK antibody SAB4500490, Anti-GAPDH antibody G9545 «Sigma-Aldrich». Прогестерон (≥ 99%) приобретен у компании «Sigma-Aldrich». 19-Гидроксипрегн-4-ен-20-он (LS-01) и 19-гидрокси-5β-прегн-3-ен-20-он (LS-02) были синтезированы как описано ранее [14]. Клетки LNCaP (карциномы простаты) и BxPC3 (аденокарциномы поджелудочной железы) человека были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC).

Клеточные культуры. Клеточные линии культивировали в стандартных условиях при 37 °C в инкубаторе с 5% CO_2. Клетки BxPC3 и LNCaP выращивали в среде RPMI-1640, в которую были добавлены 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1× (однократный) раствор смеси антибиотика и антимикотика. Четвертый пассаж культур после размораживания переносили в среду, не содержащую фенолового красного, в которую были добавлены 10% фетальной бычьей сыворотки, обработанной декстран-покрытым углем (DFBS), и антибиотики. После трех пассажей в среде, не содержащей стероиды, клетки использовали для проведения XTT-теста, анализа TUNEL, анализа связывания аннексина V, экстракции РНК и иммуноблоттинга.

Изучение экспрессии mPRs на поверхности клеток BxPC3. Клетки BxPC3 выращивали в среде с феноловым красным, снимали раствором трипсина, переносили в пробирки Eppendorf (200 000 клеток/пробирка) и осаждали центрифугированием (300 *g*, 5 мин, 20 °C). Клетки фиксировали в 3,5%-ном растворе параформальдегида в PBS в течение 10 мин; часть клеток не фиксировали. Промывку клеток производили трижды, центрифугируя и суспендируя в PBS с 0,1% Tween 20. К осадку клеток добавляли блокирующий буфер (3,5% глицин в 1% BSA–PBS–0,1% Tween 20) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре на шейкере при 150 об./мин. Затем клетки промывали раствором 1% BSA–PBS–0,1% Tween 20. После этого осадок клеток обрабатывали разведенными в 500 раз антителами к mPRα (ab75508), разведенными в 100 раз антителами к mPRβ (ab123693) или разведенными в 500 раз антителами к mPRγ (ab79517). Ранее мы использовали те же самые антитела для иммуноблоттинга и выявляли с их помощью белки ожидаемого молекулярного веса [13]. Для контроля на специфическое окрашивание использовали клетки без обработки первичными антителами в 1% BSA–PBS–0,1% Tween 20. Обработку клеток первичными антителами проводили 60 мин при 150 об./мин и 20–22 °C, отмывали и обрабатывали раствором вторичных антител, разведенных в 500 раз (Alexa Fluor 488, ab150077), в течение 60 мин при 150 об./мин и 20–22 °C. Контрольные клетки также обрабатывали вторичными антителами. После инкубации клетки трижды отмывали в PBS–0,1% Tween 20. Полученный осадок клеток суспендировали в растворе PBS и использовали для определения интенсивности флуоресцентного окрашивания Alexa Fluor 488 (канал

«FITC») на проточном цитофлуориметре (LSRFortessa, «BD Biosciences», США).

Обработка гормонами и ингибиторами киназ. Для инкубации со стероидами использовали третий пассаж клеток BxPC3 или LNCaP в среде RPMI-1640 без фенолового красного с добавками, описанными выше. Опухолевые клетки помещали в чашки Петри для культивирования или в 6/24/96-луночные планшеты и выращивали до 70% конфлюэнтности. Затем добавляли свежую среду без фенолового красного, содержащую стероиды или растворитель этанол (0,2% объема среды). Клетки подвергали воздействию различных концентраций прогестерона и селективных лигандов mPR (1, 5, 20 мкМ) в течение 48 или 72 ч. При работе с ингибиторами p38 MAPK и JNK соединения SB203580 и SP600125 растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО), разводили в среде и добавляли в лунки до конечной концентрации 15 и 2,5 мкМ соответственно. Используемые концентрации были подобраны в предварительно проведенных экспериментах. Ингибиторы добавляли как к клеткам, инкубируемым со стероидами, так и к контрольным пробам с этанолом. После окончания инкубации культуральный супернатант удаляли, клетки использовали для проведения экспериментов.

XTT-тест. Жизнеспособность клеток оценивалась с помощью XTT-теста. Клетки BxPC3 и LNCaP пересаживали в 96-луночный планшет по 10–13 тыс. клеток на лунку и оставляли на ночь при 37 °C для прикрепления к поверхности, затем клетки обрабатывали прогестероном или соединениями LS-01 и LS-02 в разных концентрациях в отсутствие или в присутствии ингибиторов, как описано выше. Затем в лунки с объемом среды 100 мкл добавляли по 50 мкл маркировочной смеси 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2H-тетразолиум-5-карбоксанилида (XTT) на лунку и инкубировали в течение 3 ч при 37 °C и 5% CO_2. Оптическую плотность образцов измеряли при 450 и 620 нм с использованием планшетного спектрофотометра (Multiscan EX «Thermo Electron Corporation», США).

TUNEL-тест. Клетки BxPC3 высеивали на 6-луночный планшет по 800 тыс. клеток на лунку, через сутки их обрабатывали гормонами в отсутствие или в присутствии ингибиторов, как описано выше. Анализ TUNEL проводили в соответствии с инструкциями производителя по протоколу для TUNEL Alexa Fluor® («Invitrogen») с использованием набора APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit с Alexa Fluor® 488 Anti-BrdU-A23210 («Invitrogen»). Количество апоптозных клеток подсчитывали методом проточной цитометрии на LSRFortessa.

Анализ клеток, окрашенных конъюгатом Annexin V–FITC. Клетки высеивали на 24-луночный планшет (из расчета 60 тыс. клеток на лунку). На следующий день производили обработку клеток исследуемыми стероидами в отсутствие и на фоне ингибиторов p38 и JNK, как описано выше. После окончания инкубации клетки снимали раствором трипсина и переносили в пробирки. Для определения апоптотических и некротических клеток использовали набор Annexin V–FITC conjugate (A13199, «Invitrogen»). Определение производили согласно рекомендациям производителя. Интенсивность флуоресцентного окрашивания клеток анализировали на проточном цитофлуориметре LSRFortessa, используя каналы «FITC» и «PerCP-cy5-5 A».

Измерение содержания мРНК. Клетки BxPC3 обрабатывали гормонами на фоне или в отсутствие ингибиторов, как описано выше. Затем тотальную РНК экстрагировали из лизированных клеток с использованием реагента TRIzol («Invitrogen»), после чего на ней синтезировали кДНК с использованием набора для обратной транскрипции ImProm-II™ Reverse Transcription System («Promega», США), следуя инструкциям производителя. Далее кДНК амплифицировали с помощью ПЦР в реальном времени на приборе Applied Biosystems 7500 («Applied Biosystems», США) с использованием набора реагентов, включающего интеркалирующие красители SYBR Green I и ROX в соответствии с рекомендациями производителя. Используемые для ПЦР специфические праймеры приведены в таблице в Приложении. Последовательности праймеров были выбраны с помощью программ Beacon Designer 7.51 (www.PremierBiosoft.com) и Primer designing tool (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) и синтезированы в «Синтол». Уровень экспрессии мРНК изучаемых генов нормировали на уровень мРНК референсного гена («домашнего хозяйства») *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы), а затем – на контрольный образец для относительного количественного определения с использованием метода ΔΔCt. Подробности описаны ранее [34].

Иммуноблоттинг. В этих экспериментах клетки BxPC3 инкубировали с различными концентрациями прогестерона и селективных лигандов mPRs (0, 1, 5, 20 мкМ) в течение 40 мин. Лизаты клеток готовили с помощью реагента для лизиса клеток (CelLytic™ M, C2978, «Sigma»), дополненного ингибитором протеаз и фосфатаз (MS-SAFE Protease and Phosphatase inhibitor, «Sigma»). Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд. Белки лизатов кле-

ток (20 мкг) разделяли электрофорезом в SDS-полиакриламидном геле и переносили на нитроцеллюлозные мембраны для блоттинга («GE Healthcare Life Sciences», Германия) в течение 1 ч. Затем мембраны обрабатывали в течение 1 ч блокирующим буфером – PBS, содержащим 0,1% Tween 20 и 2% блокирующего агента (ECL Advance Blocking Agent, «GE Healthcare Life Sciences»), и инкубировали с первичными антителами к фосфо-p38 MAPK (Thr180, Tyr182), p38 MAPK, активированной JNK (Thr183, Tyr185-дифосфорилированной JNK), JNK или GAPDH в течение ночи при 4 °C. После этого мембраны промывали физиологическим раствором на основе Tris-буфера, содержащим 0,1% Tween 20, и инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена («GE Healthcare Life Sciences», Великобритания) в течение 1 ч при комнатной температуре, затем опять промывали. Сигналы регистрировали с помощью реагента ECL SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate («Thermo Scientific») на приборе ChemiDoc MP system («Bio-Rad», США).

Статистический анализ. Результаты измерений представлены как среднее ± стандартное отклонение. Для статистического анализа использовали программу GraphPad Prism 6.01 («GraphPad Software», США). Данные проанализированы при помощи однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с использованием критерия Даннетта для множественных сравнений (Dunnett's multiple comparisons test). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выявление белков mPRs в клетках BxPC3 с помощью цитофлуориметрии с использованием антител к внутреннему и *C*-концевым участкам рецепторных белков α, β и γ субтипов. Для выявления mPRα были использованы первичные поликлональные антитела (АТ) ab75508, выработанные к внутреннему домену этого белка; для выявления mPRβ и mPRγ – АТ ab123693 и ab79517, выработанные к *C*-концевым участкам соответствующих субтипов рецепторов. При проточной флуориметрии клеток BxPC3 без фиксации (рис. 1, *а*, *б*, *в*) мы наблюдаем пики при совместной обработке (в центре) вторичными и первичными АТ к mPRα, β и γ (ab75508, ab123693 и ab79517), аналогичные тем, что визуализируются при обработке только вторичными АТ (слева). Эти пики при совмещении практически сливаются (справа). Следовательно, первичные АТ не взаимодействуют с интактными нефиксированными клетками. Как видно на рис. 2 (*а*, *б*, *в*), при анализе с помощью проточной флуориметрии пики флуоресценции фиксированных 3,5%-ным параформальдегидом клеток, обработанных первичными АТ к разным субтипам mPRs с последующей обработкой вторичными АТ, сдвинуты в область более интенсивной флуоресценции по сравнению с теми, что характерны для клеток, обработанных только вторичными АТ. Таким образом, после фиксации клеток первичные АТ получили доступ к специфическим эпитопам, находящимся внутри клетки во внутреннем участке белка mPRα или на *C*-концевом участке белков mPR субтипов β и γ, следовательно, *C*-концевой домен mPRs погружен внутрь клетки. Полученные в этом эксперименте данные дополнительно подтверждают результаты иммуноблоттинга [13] касательно наличия белковых продуктов mPRs в клетках BxPC3.

Эффект прогестерона и селективных лигандов mPRs на жизнеспособность клеток BxPC3 и клеток LNCaP человека, взятых в качестве негативного контроля в связи с отсутствием в них рецепторов прогестерона. По результатам XTT-теста на клеточной линии BxPC3 с максимальным уровнем экспрессии mPRs через 72 ч инкубации P4 вызывал достоверное снижение жизнеспособности клеток на 10% ($p = 0,0431$) и 45% ($p < 0,0001$) в концентрациях 5 и 20 мкМ соответственно. Соединение LS-01 в тех же концентрациях вызывало снижение жизнеспособности клеток BxPC3 на 7% и 15% соответственно ($p < 0,0001$). Соединение LS-02 достоверного эффекта не оказывало (рис. 3). Достоверного влияния изучаемых стероидов на жизнеспособность клеток LNCaP обнаружено не было.

Эффект прогестерона и селективных лигандов mPRs на жизнеспособность клеточных линий человека BxPC3 и LNCaP в присутствии ингибиторов p38 MAPK и JNK. Рис. 4, *а* демонстрирует, что по результатам XTT-теста действие P4 и селективных лигандов на подавление жизнеспособности клеток BxPC3 усиливалось в присутствии ингибитора p38 MAPK, SB203580. Жизнеспособность клеток достоверно снижалась до значений 78% ($p = 0,0026$), 65% ($p < 0,0001$) и 44% ($p < 0,0001$) от контроля под действием прогестерона в концентрациях 1, 5 и 20 мкМ соответственно и до 77% ($p = 0,0043$), 81% ($p = 0,0015$) и 59% ($p < 0,0001$) соответственно под действием соединения LS-01 в тех же концентрациях. Стоит отметить, что соединение LS-02, которое не влияло на пролиферативную активность клеток BxPC3, все же начинало

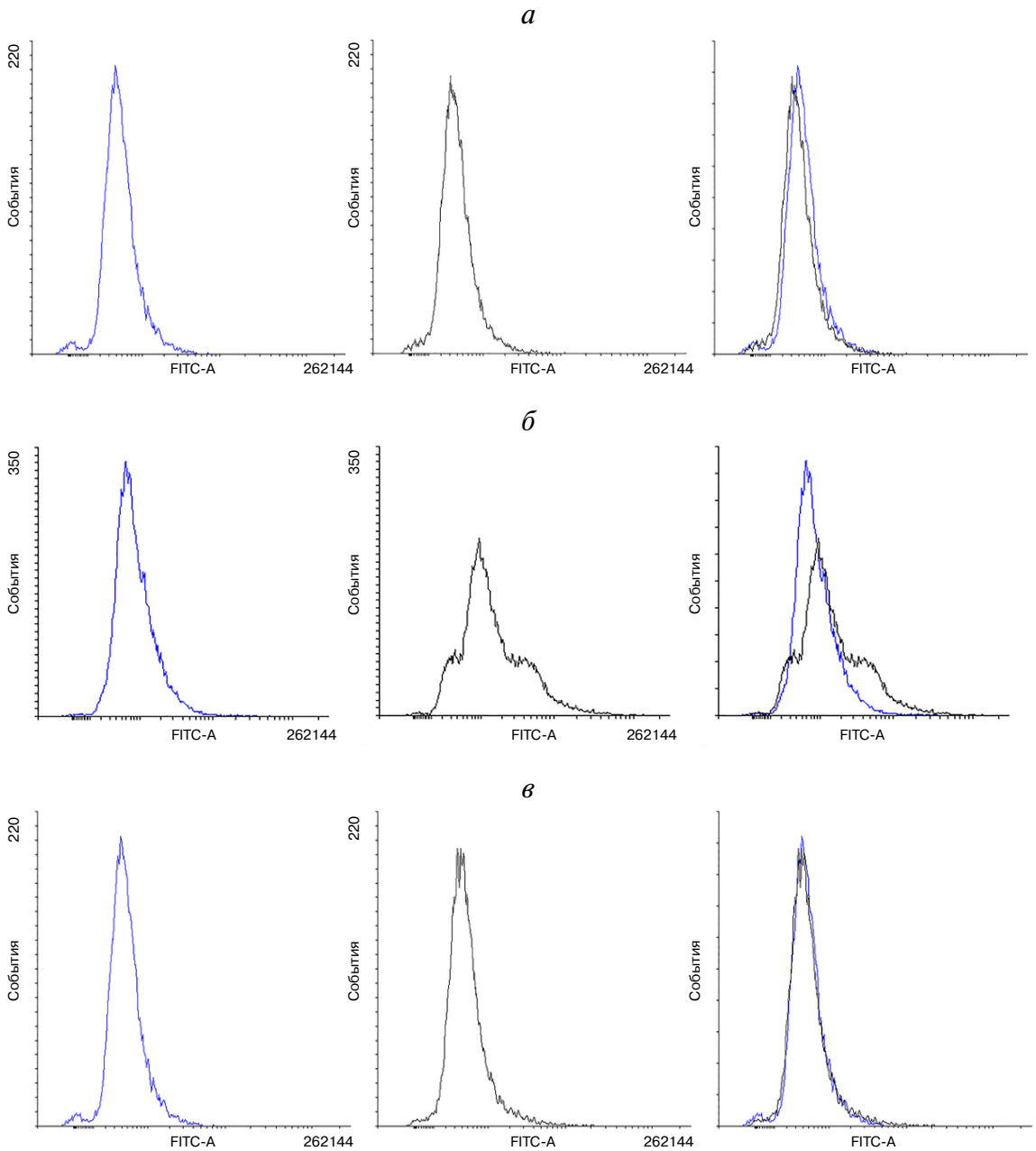

Рис. 1. Данные цитофлуориметрии клеток BxPC3 без фиксации, обработанных либо только вторичными АТ (слева), либо первичными АТ с последующей обработкой вторичными АТ (в центре); совмещение обоих пиков (справа). *а* – Первичные АТ к mPRα, *б* – первичные АТ к mPRβ, *в* – первичные АТ к mPRγ

действовать на фоне этого ингибитора, но только в максимальной концентрации, 20 мкМ, снижая жизнеспособность клеток до 64% ($p < 0{,}0001$) от контроля. Противоположная картина наблюдалась на фоне ингибитора SP600125, подавляющего активность JNK – действие стероидов практически сводилось к нулю (рис. 4, *б*), лишь максимальная концентрация P4 оказывала слабый эффект. Жизнеспособность клеток LNCaP на фоне ингибиторов достоверно не изменялась под действием прогестерона и соединений LS-01, LS-02 – также, как и в отсутствие ингибиторов.

Эффект прогестерона и селективных лигандов mPRs на фрагментацию ДНК ядер клеток BxPC3 человека в отсутствие и в присутствии ингибиторов киназ, SB203580 и SP600125. Классическим стандартом для определения апоптоза в клетках является обнаружение в их ядрах фрагментированной ДНК с помощью TUNEL-

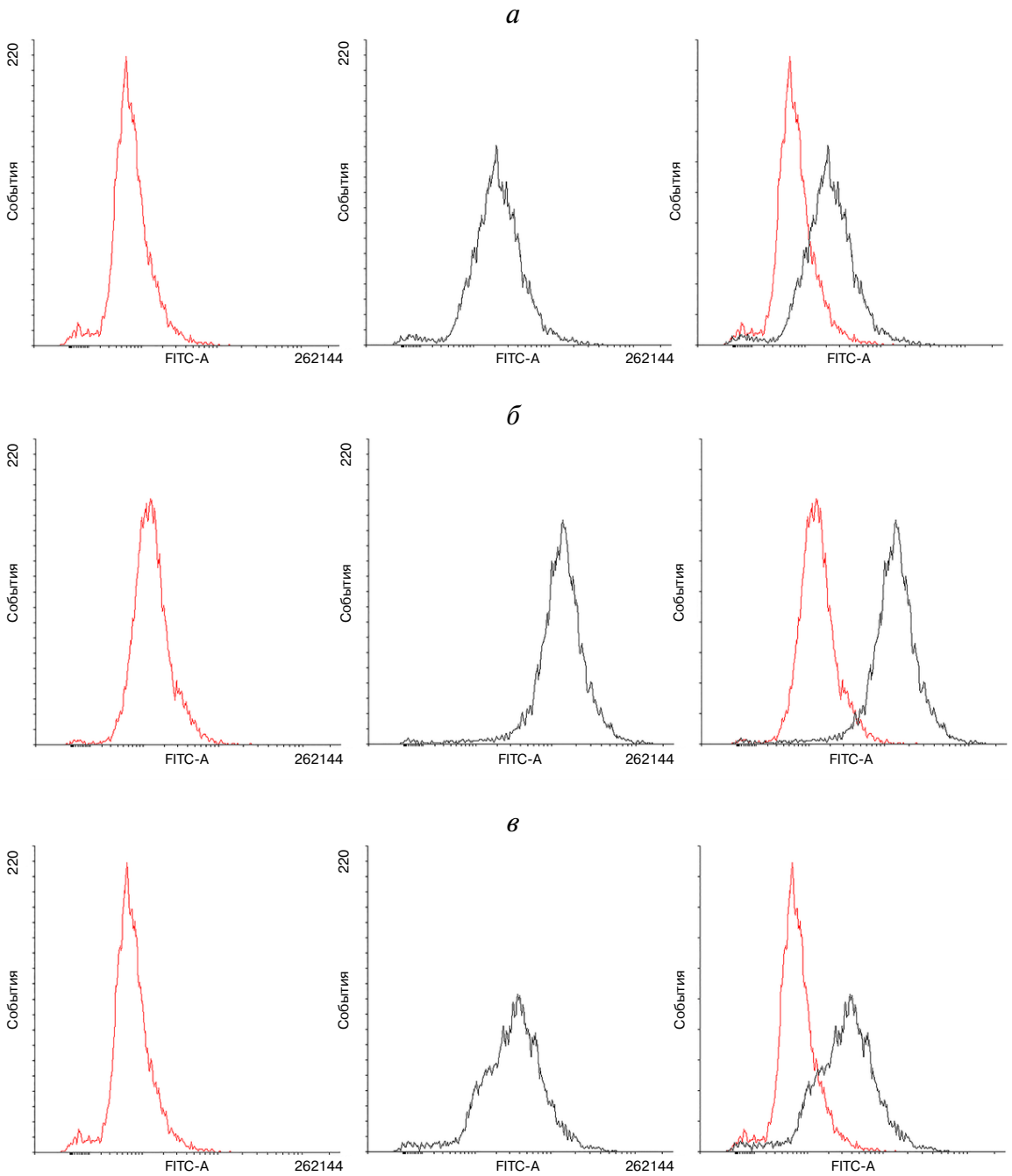

Рис. 2. Данные цитофлуориметрии клеток BxPC3 после фиксации 3,5%-ным параформальдегидом, обработанных либо только вторичными АТ (слева), либо первичными с последующей обработкой вторичными АТ (в центре); совмещение обоих пиков (справа). *а* – Первичные АТ к mPRα, *б* – первичные АТ к mPRβ, *в* – первичные АТ к mPRγ

теста. Мы изучили действие на этот параметр 3 стероидов в максимально используемой концентрации 20 мкМ через 72 ч инкубации в сравнении с контролем без воздействия гормонов. Результаты одного из 4 экспериментов приведены на рис. 5. Можно видеть, что все 3 соединения вызывают появление (или значительное увеличение) пика с высокой интенсивностью флуоресценции, обусловленное взаимодействием меченых антител с разрывами ДНК после включения в них 5-бром-2′-дезоксиуридинов. Результаты статистического обсчета всех 4 экспериментов TUNEL-анализа показали, что в контроле в среднем обнаруживается 5,5% клеток в процессе апоптоза, в присутствии P4 это значение возрастает до 19% (p = 0,0012), соеди-

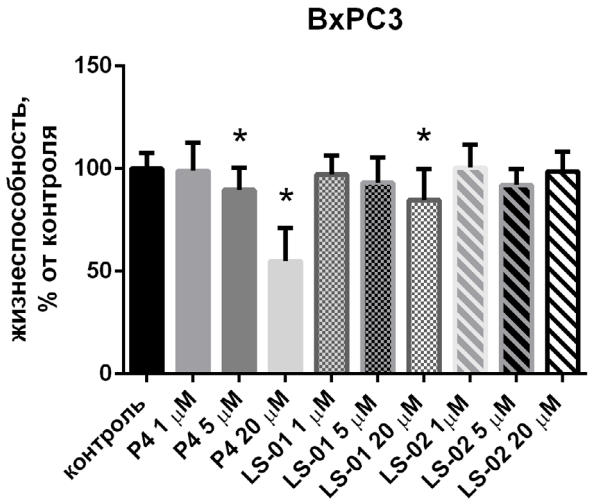

Рис. 3. Действие прогестерона (P4) и соединений LS-01 и LS-02 на жизнеспособность клеток BxPC3, определяемую с помощью XTT-теста. Статистическая значимость различий определена с применением one-way ANOVA и критерия Даннетта для множественных сравнений, приведено значение среднего ± стандартного отклонения по 4–5 независимым экспериментам. * Достоверные различия с контролем, где $p < 0,05$

нения LS-01 – до 17,3% ($p = 0,0043$), соединения LS-02 – до 12,5% ($p = 0,0894$).

В присутствии ингибитора p38 MAPK эффекты стероидов на уровень фрагментации ДНК клеток не отличались от контроля, а на фоне ингибитора JNK сохранялись, но несколько ослабевали. В среднем на фоне ингибитора SP600125 в контроле наблюдалось 4% клеток в процессе апоптоза, в присутствии P4 – 18,7% ($p = 0,0271$), LS-01 – 14% ($p = 0,1674$), LS-02 – 7,3% ($p = 0,8771$).

Эффект прогестерона и селективных лигандов mPRs на экспонирование фосфатидилсерина на наружной мембране клеток BxPC3 человека и на проницаемость их мембран для йодистого пропидия. Еще одним признаком апоптоза клеток является экспонирование фосфолипида фосфатидилсерина на их поверхности, обнаруживаемого по связыванию с меченым аннексином V при проточной цитометрии. В нашем эксперименте параллельно с клетками, имеющими признаки апоптоза, определяли некротические клетки, мембраны которых становятся проницаемы для йодистого пропидия. После 72 ч воздействия на клетки BxPC3 прогестерона или изучаемых стероидов LS-01 и LS-02 в максимально используемой концентрации (20 мкМ) мы не обнаружили достоверных различий между контролем и образцами, инкубированными с гормонами – ни в связывании клеток с меченым аннексином V, ни в проницаемости их мембран для йодистого пропидия. Также были проведены эксперименты по определению уровня связывания меченого аннексина V через 48 ч инкубации со стероидами в концентрации 20 мкМ. Оказалось, что только соединение LS-02 достоверно увеличивало количество клеток, связывающих аннексин V, и тех, чьи мембраны стали проницаемы для йодистого пропидия. При статистическом обсчете экспериментальных данных по проточной цитометрии клеток BxPC3 в контроле (рис. 6, *а*) и после инкубации в течение 48 ч с 20 мкМ соединения LS-02 (рис. 6, *б*)

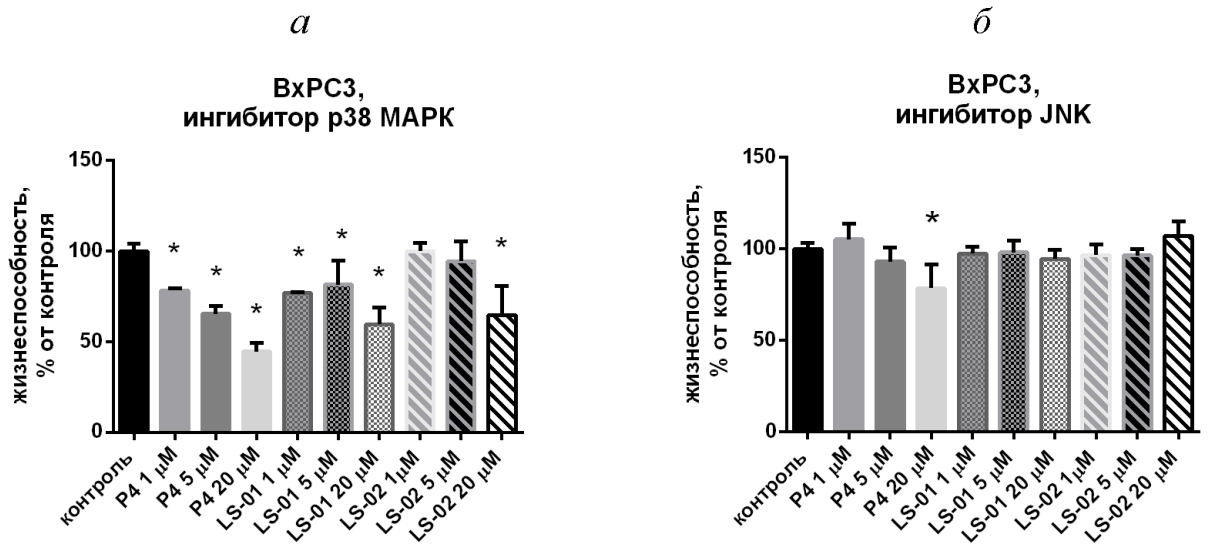

Рис. 4. Действие прогестерона (P4) и соединений LS-01 и LS-02 на жизнеспособность клеток BxPC3 на фоне ингибиторов киназ SB203580 (*а*) и SP600125 (*б*), определяемую с помощью XTT-теста. Статистическая значимость различий определена с помощью one-way ANOVA и критерия Даннетта для множественных сравнений, приведено значение среднего ± стандартного отклонения по 3 независимым экспериментам. * Достоверные различия с контролем, где $p < 0,05$

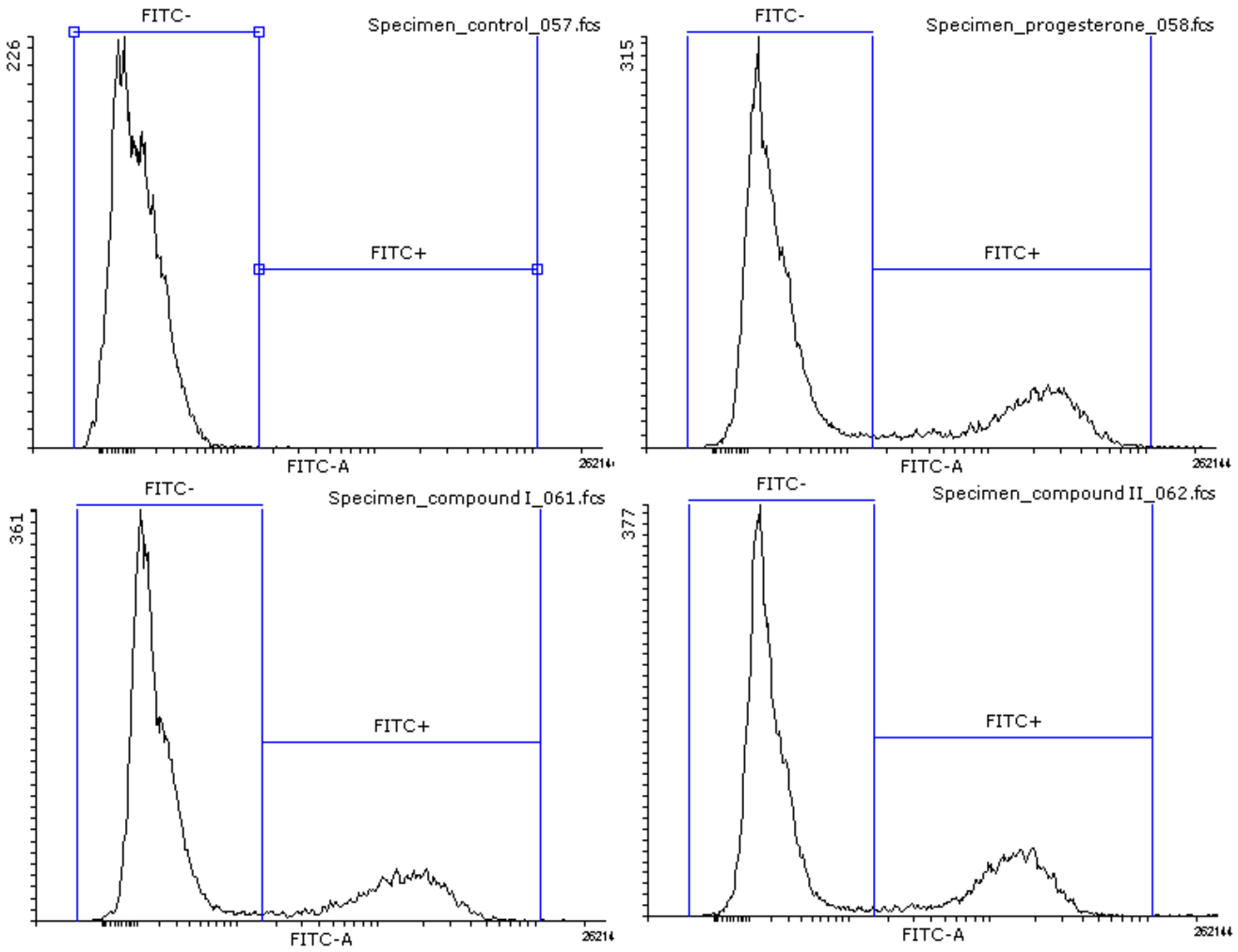

Рис. 5. Результаты одного из 4 повторов TUNEL-теста, демонстрирующие действие прогестерона, а также соединений LS-01 и LS-02 на появление пика флуоресценции, соответствующего клеткам с фрагментированной ДНК. Верхний левый график – контроль, верхний правый график – действие 20 мкМ прогестерона, левый нижний график – действие 20 мкМ соединения LS-01 (I), правый нижний график – действие соединения LS-02 (II)

наблюдалось увеличение пиков, характеризующих число клеток, связавших аннексин V, в 1,3 раза (p = 0,0171) по сравнению с контролем; пиков, характеризующих число клеток, поглотивших йодид пропидия – в 1,4 раза (p = 0,0545); а также пиков, соответствующих клеткам, одновременно связывающим аннексин V и проницаемых для йодида пропидия – в 1,5 раза (p = 0,0304) от контрольных значений. Соединение LS-02 теряло активность на фоне обоих ингибиторов, SB203580 и SP600125, как в области своего действия на апоптотические изменения мембран клеток BxPC3, так и в модуляции проницаемости мембран для йодистого пропидия.

Регуляция прогестероном и селективными лигандами mPRs в клетках BxPC3 экспрессии генов факторов, связанных с процессами пролиферации и апоптоза, как в отсутствие ингибиторов киназ, так и на их фоне. Методом обратной транскрипции и последующей ПЦР в реальном времени было изучено действие трех стероидов в концентрациях 5 и 20 мкМ на уровень мРНК маркеров пролиферации, Ki67, PCNA и циклина D1, а также ингибиторов циклин-зависимых киназ, p21 и p27, через 72 ч их инкубации с клетками BxPC3. В отсутствие ингибиторов киназ P4 снижал содержание мРНК Ki67 в клетках в среднем до 77% и 51% (p < 0,0001) от контрольного уровня при концентрациях 5 и 20 мкМ соответственно; мРНК циклина D1 – до 85% и 48% (p < 0,0001); мРНК PCNA – до 83% и 60% (p < 0,0001); повышал уровень мРНК p21 в 1,2 и 2,3 раза (p < 0,0001) по сравнению с контролем в концентрациях 5 и 20 мкМ соответственно. Уровень мРНК p27 достоверно не изменялся при 72-часовой инкубации ни с одним из трех стероидов. Соединение LS-01 в концентрации 5 мкМ слабо действовало на экспрессию изуча-

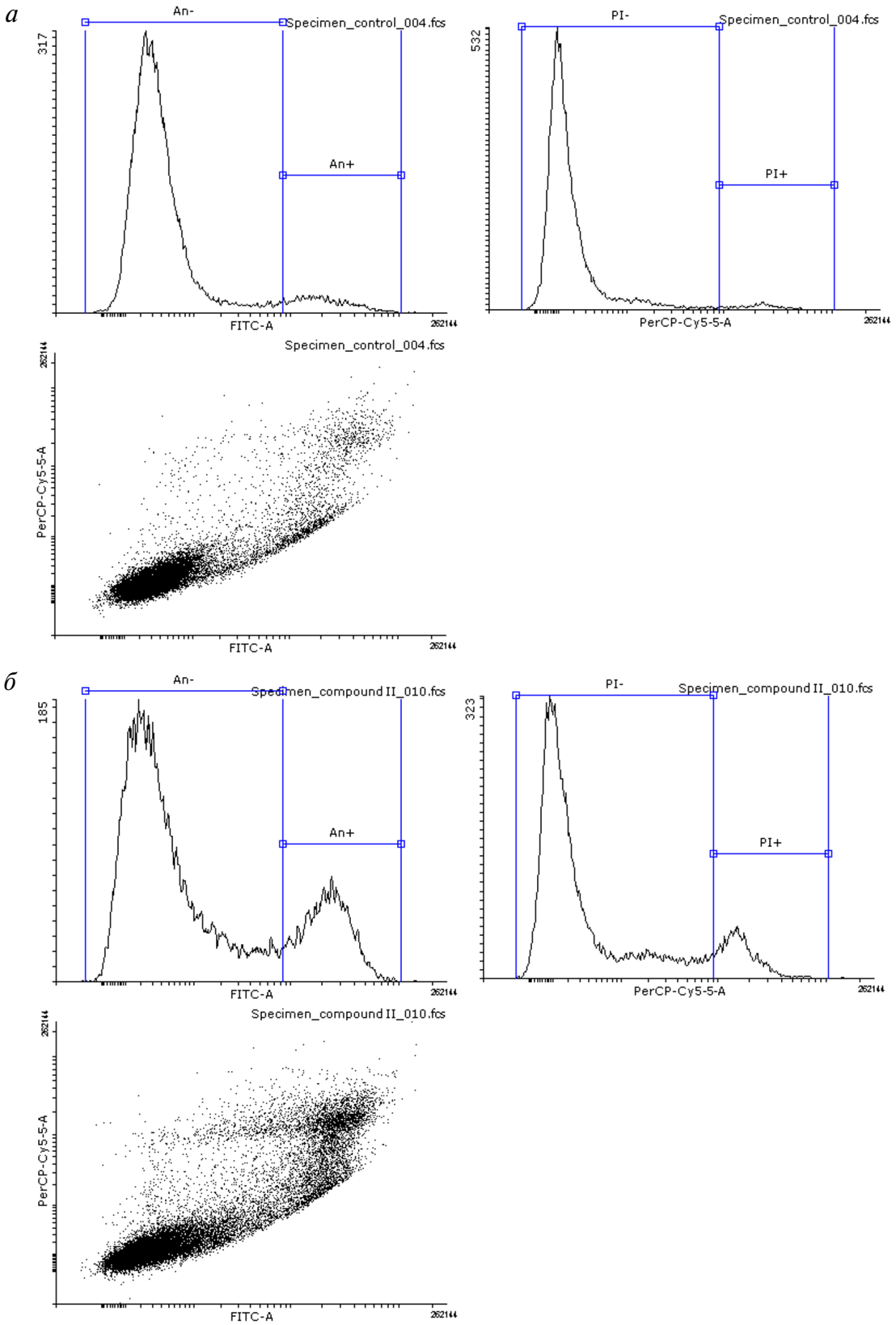

Рис. 6. *а* – Графики и точечная диаграмма распределения клеток в контрольном эксперименте по связыванию меченого аннексина V и поглощению йодистого пропидия; *б* – графики и точечная диаграмма распределения клеток под воздействием соединения LS-02 (II) в течение 48 ч в эксперименте по связыванию меченого аннексина V и поглощению йодистого пропидия

емых генов. В концентрации 20 мкМ наиболее сильный эффект, аналогичный прогестерону, оно оказывало на содержание в клетках мРНК циклина D1 и PCNA, снижая в среднем их уровень до 63% ($p < 0,0001$) и 77% ($p = 0,0998$) от контроля соответственно. Соединение LS-02 не влияло на жизнеспособность клеток в XTT-тесте и не изменяло экспрессии изучаемых генов факторов, связанных с пролиферацией. В присутствии ингибитора p38 MAPK эффекты P4 и соединения LS-01 на экспрессию генов факторов пролиферации нивелировались, за исключением гена, кодирующего белок Ki67. Такая же ситуация с подавлением экспрессии кодирующего Ki67 гена наблюдалась и на фоне ингибитора JNK для прогестерона и соединения LS-01, тогда как их эффекты на экспрессию трех других генов тоже исчезали в присутствии SP600125. Таким образом, уровни мРНК циклина D1, PCNA, а также ингибитора циклинзависимых киназ p21 регулируются прогестинами в этих клетках с участием не только p38 MAPK, но и JNK, в то время как экспрессия гена, кодирующего Ki67, подавляется ими через другой сигнальный путь с не выявленным в нашем исследовании посредником.

В настоящей работе мы также изучали действие P4 и двух селективных лигандов mPRs на экспрессию 12 генов факторов, связанных с программируемой гибелью клеток путем апоптоза. Определялся уровень мРНК каспаз 3, 8 и 9, BAD, BAX, BCL2A1, DAPK, FAS, HRK, APAF1, BIK и p53. В отсутствие ингибиторов P4 и соединение LS-01 снижали уровень экспрессии двух генов – *BCL2A1* и *BAX*, причем достоверным было только воздействие максимальных концентраций обоих стероидов на экспрессию *BCL2A1*. Прогестерон в концентрациях 5 и 20 мкМ снижал содержание мРНК антиапоптотического фактора BCL2A1 в среднем до 75% и 28% ($p < 0,0001$) от контрольных значений, а соединение LS-01 – до 67% и 35% ($p < 0,0001$) от контроля соответственно. Все три изучаемых стероида повышали уровень мРНК проапоптотического HRK, но только эффект максимально используемой концентрации соединения LS-02 был достоверным в отсутствие ингибиторов киназ. P4 повышал содержание мРНК HRK в 1,3 и 1,7 раз в зависимости от концентрации; соединение LS-01 – в 1,5 раза; соединение LS-02 – в 1,6 и 2,7 раза ($p < 0,0001$) при концентрациях 5 и 20 мкМ соответственно. Также в концентрации 20 мкМ соединение LS-02 достоверно повышало содержание мРНК каспазы 9 в 1,4 раза ($p = 0,0003$) и DAPK – в 1,7 раз ($p < 0,0001$). Таким образом, при действии соединения LS-02 повышалась экспрессия трех генов проапоптотических факторов, тогда как действие P4 и соединения LS-01 на уровни изучаемых мРНК, связанных с апоптозом генов, было неоднозначно, поскольку они подавляли экспрессию не только *BCL2A1*, но и *BAX*. На фоне ингибитора p38 MAPK проапоптотический эффект соединения LS-02 еще более усиливался. Наблюдался подъем уровня мРНК каспазы 3 в среднем в 1,5 раза ($p < 0,0001$) при его концентрации в 20 мкМ, а подъем уровня мРНК каспазы 9 в 1,6 раз ($p = 0,0006$) происходил уже при концентрации 5 мкМ, в 1,7 раза ($p < 0,0001$) – при 20 мкМ; повышался уровень мРНК BAD в 1,4 ($p = 0,0008$) и 1,7 раза ($p < 0,0001$), а мРНК BAX – в 1,5 ($p = 0,0328$) и 1,6 раз ($p = 0,0053$) при 5 и 20 мкМ стероида соответственно. Сохранялось действие LS-02 на фоне ингибитора SB203580 на усиление экспрессии гена *HRK* в 1,4 и 2,6 раз ($p = 0,0017$), но пропадал стимулирующий эффект на экспрессию гена *DAPK*. У P4 и соединения LS-01 на фоне ингибитора p38 MAPK полностью исчезало подавляющее действие на экспрессию гена *BAX* и несколько ослабевало влияние прогестерона на уровень мРНК BCL2A1. Как и соединение LS-02, на фоне SB203580 два других стероида повышали уровень мРНК BAD: прогестерон – в 1,1 и 1,4 раза ($p = 0,0038$), а соединение LS-01 – в 1,5 ($p = 0,0002$) и 1,3 раза ($p = 0,0162$) в зависимости от их концентраций. Ингибитор JNK не оказывал никакого влияния на эффекты LS-02 в отношении регуляции экспрессии генов факторов апоптоза. Если соединение LS-02 действовало в отсутствие ингибитора, то продолжало действовать и в его присутствии; если же оно не демонстрировало достоверной активности, то и на фоне ингибитора JNK оставалось неактивным. Также этот ингибитор не влиял на подавление прогестероном и соединением LS-01 экспрессии *BCL2A1*. На фоне SP600125, во-первых, исчезал эффект соединения LS-01 на подавление экспрессии гена *BAX*; во-вторых, в его присутствии усиливались стимулирующие эффекты P4 и соединения LS-01 на уровень мРНК HRK. P4 повышал его в 1,2 и 3,1 раза ($p < 0,0001$) по сравнению с контрольными значениями, соединение LS-01 – в 1,6 и 2,7 раз ($p < 0,0001$) выше контроля в зависимости от концентрации. Из результатов этих экспериментов можно сделать заключение, что участие JNK в регуляции подавления пролиферативной активности клеток BxPC3 и регуляции экспрессии генов, с нею связанных, является более значимым, чем ее посредничество в регуляции экспрессии факторов апоптоза и самого процесса программируемой гибели клеток под действием изучаемых стероидов. JNK – один из медиаторов сигнальных пу-

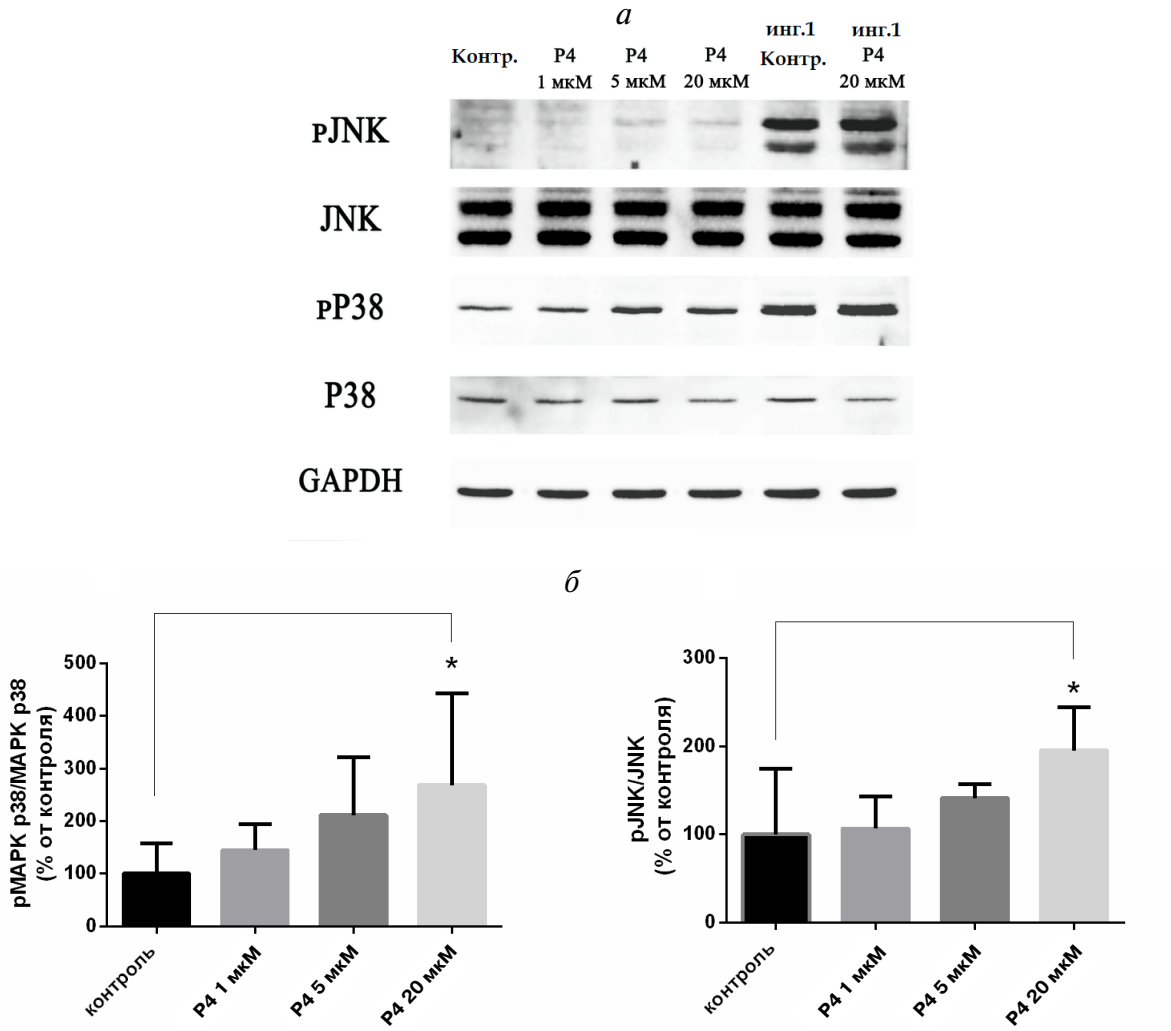

Рис. 7. Эффект прогестерона (P4) на фосфорилирование JNK и p38 MAPK в клетках BxPC3. *а* – Иммуноблоттинг лизатов клеток BxPC3, обработанных P4 в концентрациях 1, 5 и 20 мкМ и ингибитором (инг.1) SB203580. На фотографии представлены фосфорилированная форма (pJNK) и общая JNK, фосфорилированная форма (pP38) и общая p38 MAPK, референсный белок (GAPDH). *б* – Денситометрический анализ результатов иммуноблоттинга: слева – соотношение фосфорилированной формы p38 MAPK к тотальному белку p38 MAPK в лизатах клеток BxPC3 в контроле и при действии 1, 5 и 20 мкМ прогестерона. Приведено значение среднего ± стандартного отклонения по 13 независимым экспериментам; справа – отношение суммарного уровня фосфорилированных изоформ JNK к суммарному уровню всех изоформ JNK в лизатах контрольных и обработанных 1, 5 и 20 мкМ прогестерона клеток BxPC3. Приведено значение среднего ± стандартного отклонения по 7 независимым экспериментам. Статистическая значимость различий определена с помощью one-way ANOVA и критерия Даннетта для множественных сравнений. * Достоверные различия с контролем, где $p < 0,05$

тей, активируемых через mPRs прогестероном и селективными лигандами этих рецепторов в клетках BxPC3. Посредниками их действия также являются p38 MAPK и, по-видимому, еще какой-то не выявленный нами сигнальный каскад.

Прогестерон и селективные лиганды mPRs стимулируют активирующее фосфорилирование p38 MAPK и JNK. Изучение регуляции стероидами процессов пролиферации клеток BxPC3 и их гибели путем апоптоза на фоне ингибиторов SB203580 и SP600125 показало, что обе киназы – p38 MAPK и JNK – могут быть медиаторами сигнальных путей, активируемых через mPRs и действующих на разные мишени внутри этих клеток. Для подтверждения данного предположения мы изучили регуляцию фосфорилирования этих двух киназ под действием изучаемых соединений, ведущее к повышению их активности. С помощью антител к фосфорилированным формам этих ферментов и к белкам вне зависимости от их фосфорилирования было показано, что все три стероида дозозависимо активируют p38 MAPK и суммарно – все изоформы JNK (рис. 7, 8).

На рисунке 7 приведены результаты анализа вестерн-блоттинга фосфорилированных форм

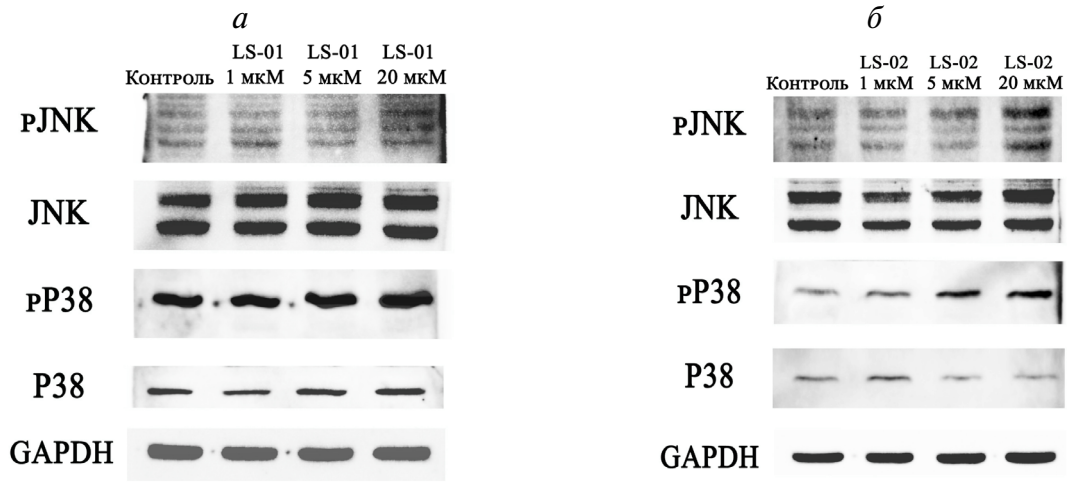

Рис. 8. Эффект соединения LS-01 (*а*) и LS-02 (*б*) на фосфорилирование JNK и p38 MAPK в клетках BxPC3. Иммуноблоттинг лизатов клеток BxPC3, обработанных соединением LS-01 или LS-02 в концентрациях 1, 5 и 20 мкМ. На фотографии представлены фосфорилированная форма (pJNK) и общая JNK, фосфорилированная форма (pP38) и общая p38 MAPK, а также референсный белок (GAPDH)

JNK и p38 MAPK при действии возрастающих концентраций P4. Фосфорилирование обеих киназ усиливалось прогестероном. Также на рисунке видно, что на фоне ингибитора p38 MAPK фосфорилирование самой киназы p38 усиливается. Это происходит, видимо, вследствие того, что механизм действия ингибитора SB203580 заключается в блокировании связывания ATP в соответствующем кармане фермента, при этом он не ингибирует фосфорилирование p38 MAPK вышерасположенными в сигнальном каскаде (upstream) киназами. В результате по механизму отрицательной обратной связи upstream киназы становятся значительно активнее, пытаясь восстановить инактивированный ингибитором фермент. Особый интерес представляет неожиданное усиление фосфорилирования JNK на фоне этого ингибитора p38 MAPK (рис. 7, *а*). По-видимому, в клетках BxPC3 JNK и p38 MAPK фосфорилируются общей upstream киназой. Действие ингибитора SP600125 было ожидаемым и приводило к снижению фосфорилирования JNK. На рис. 7, *б* представлены гистограммы результатов статистического обсчета денситометрического анализа данных вестерн-блоттинга по фосфорилированию p38 MAPK (13 экспериментов) и фосфорилированию JNK (7 экспериментов) под действием 3 различных концентраций прогестерона. P4 в зависимости от концентрации повышает активирующее фосфорилирование p38 MAPK в среднем в 1,5; 2,1 и 2,7 раза (p = 0,013), JNK – в 1,1; 1,4 и 2 раза (p = 0,043) для всех изоформ суммарно.

С соединениями LS-01 и LS-02 было проведено по 3 независимых эксперимента. Их результаты показали, что под действием LS-01 фосфорилирование p38 MAPK повышается в среднем в 1,7–2 раза, фосфорилирование суммарно всех изоформ JNK повышается в среднем в 1,1; 1,3 и 1,6 раз в зависимости от концентрации; под действием LS-02 фосфорилирование p38 MAPK повышается в среднем в 1,3; 2,4 и 2,5 раза, фосфорилирование суммарно всех изоформ JNK повышается в среднем в 2,0–2,2 раза (рис. 8, *а, б*). Таким образом, P4 и селективные лиганды, изучаемые в данной работе, активируя mPRs в клетках BxPC3, запускают сигнальные каскады с участием как p38 MAPK, так и JNK, действующие на разные конкретные мишени в этих клетках.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе впервые было изучено действие селективных лигандов mPRs в сравнении с прогестероном на пролиферативную активность и программируемую гибель клеток путем апоптоза и некроза. Главной целью было исследование роли mPRs в этих процессах, которая пока еще слабо изучена в опухолевых клетках.

Ранее было показано, что уровень мРНК mPRs в клетках BxPC3 аденокарциномы поджелудочной железы человека наиболее высок среди всех изученных линий опухолевых клеток человека и составляет для субтипа α 270%, β – 27% и γ –283% от уровня мРНК GAPDH, при этом мРНК nPRs в этих клетках практически не обнаруживается [13]. В клетках LNCaP аденокар-

циномы предстательной железы, наоборот, содержание мРНК mPRs было очень низким: для субтипов α и γ – менее 1%, для β – 2% от уровня мРНК GAPDH, в то время как nPRs также не были обнаружены. Таким образом, это послужило причиной выбора данной клеточной линии в качестве негативного контроля в наших экспериментах. Изучение белкового состава рецепторов прогестерона методом иммуноблоттинга подтвердило ранее сделанные выводы, продемонстрировав наличие в клетках BxPC3 всех трех субтипов mPRs и отсутствие nPRs [13]. В данной работе мы еще одним методом подтвердили экспрессию мембранных рецепторов прогестерона в этих клетках, определив вместе с этим топологию *C*-концевого участка указанных белков. Ранее с использованием биоинформатических алгоритмов было предсказано внеклеточное расположение *C*-конца mPRs [29]. Такая прогнозируемая топология затрудняла объяснение фактов, свидетельствующих о функционировании некоторых субтипов mPRs как рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCRs) [24, 27, 28]. Топологию разных субтипов этих рецепторов исследовали в ряде работ, однако полного единства мнений по этому вопросу достигнуто не было [17, 27, 31]. Так, в клетках CHO после транзиентной трансфекции экспрессированные mPRs имели внутриклеточный *N*-конец и внеклеточный *C*-конец, то есть топологию, аналогичную топологии рецепторов адипонектина и «противоположную» GPCRs [30]. В нашей работе целые нефиксированные клетки BxPC3 не взаимодействовали с АТ к *C*-концу mPRβ и γ, так же, как и с АТ к внутриклеточному домену mPRα (рис. 1, *а*, *б*, *в*). Очевидно, данные эпитопы находятся не на наружной поверхности мембран. При фиксации клеток ситуация изменилась, в данных условиях АТ связывались со ставшими доступными внутриклеточными фрагментами mPRs, и пики флуоресценции сдвинулись в область яркого свечения (рис. 2, *а*, *б*, *в*). Таким образом, было показано, что *C*-концевой фрагмент всех трех белков mPRs имеет внутриклеточное расположение. Наши результаты на клетках BxPC3 подтверждают данные, полученные другими исследователями для mPRα в трансфицированных клетках MDA-MB-231 и для mPRβ – в нейрональных клетках линии PC12 [17, 27].

Мы использовали клетки BxPC3 с максимальным уровнем экспрессии mPRs и клетки LNCaP с крайне низким их содержанием как негативный контроль для изучения влияния P4 и селективных лигандов на пролиферативную активность этих клеток. Инкубация с тремя концентрациями изучаемых стероидов проводилась в течение 72 ч. Время было выбрано по результатам предыдущего исследования, в котором наблюдались изменения жизнеспособности клеток под действием P4 в зависимости от времени инкубации с гормоном [13]. Как видно из результатов XTT-теста, на клетки с высоким уровнем mPRs ингибирующее действие оказывали P4 и один из селективных лигандов – соединение LS-01 (рис. 3). На жизнеспособность клеток LNCaP статистически достоверного эффекта стероидов обнаружено не было. В клетках BxPC3 мишенями действия прогестерона среди изучаемых в нашей работе оказались гены белков Ki67, циклина D1, PCNA, а также ингибитора циклин-зависимых киназ p21. Через регуляцию их экспрессии P4 может влиять на процесс пролиферации. Соединение LS-01 действовало слабее, наиболее значительный эффект оно оказывало на экспрессию гена циклина D1. Соединение LS-02 не влияло ни на жизнеспособность клеток BxPC3, ни на экспрессию генов факторов, связанных с пролиферацией.

Действие P4 и селективных лигандов на разные стадии программируемой гибели клеток значительно различалось. Через 48 ч инкубации со стероидами статистически значимое действие на стадии гибели клеток BxPC3, связанные с изменениями мембран, оказало только соединение LS-02 (рис. 6). Под действием этого стероида достоверно увеличивалось количество клеток с измененными мембранами, экспонирующими фосфатидилсерин, также повышалось число некротических клеток. Через 72 ч воздействия данный эффект этого соединения нивелировался до контрольного уровня. На другие стадии апоптоза, связанные с фрагментацией ДНК клеток, через 72 ч воздействия эффект оказывали все три стероида (рис. 5), причем P4 и LS-01 были наиболее эффективны, в то время как LS-02 действовало на этот процесс несколько слабее. Выявленной мишенью в регуляции апоптоза для прогестерона и соединения LS-01 является ген белка BCL2A1, экспрессия которого подавляется этими стероидами. Для соединения LS-02 показано, что его действие приводит к повышению уровня мРНК HRK, каспазы 9 и DAPK, стимулируя таким образом процесс апоптоза в клетках BxPC3.

Изучение влияния стероидов на активирующее фосфорилирование p38 MAPK и JNK показало, что все три соединения стимулируют активность этих киназ, следовательно, оба фермента являются посредниками в действии этих соединений – в зависимости от направленности эффекта (рис. 7, 8). При проверке действия ингибиторов на фосфорилирование мишеней их действия, p38 MAPK и JNK, эффект ингибитора

SP600125 был ожидаемым, а эффект SB203580 в этих клетках оказался двойственным (рис. 7, *а*). Оказалось, что ингибитор SB203580 не только инактивировал объект своего действия, p38 MAPK, но также приводил к значительному усилению фосфорилирования JNK, повышая ее активность. Происходило это, видимо, по причине того, что ингибирующее действие SB203580 не связано с блокированием фосфорилирования p38 MAPK upstream киназами. В результате эти киназы, пытаясь восстановить активность одной своей мишени, вместо этого активировали другой фермент. Согласно некоторым данным литературы, в ряде клеток p38 MAPK и JNK активируются киназой MKK4 [35]. В результате такого двойственного действия в ряде случаев оказалось затруднительным определить причины изменений, происходящих при действии стероидов на фоне ингибиторов.

Изучение участия сигнальных каскадов p38 MAPK и JNK в действии прогестинов на исследуемые процессы с использованием ингибиторов выявило факт посредничества JNK в ингибирующем действии прогестерона и соединения LS-01 на пролиферативную активность клеток BxPC3. На фоне ингибитора JNK действие P4 существенно ослабевало, а действие соединения LS-01 исчезало полностью. На фоне ингибитора p38 MAPK действие изучаемых соединений усиливалось, вероятно, вследствие неожиданного эффекта этого ингибитора на усиление активности JNK, что также подтверждает ее участие в подавлении жизнеспособности клеток BxPC3 (рис. 4). В клетках LNCaP стероиды не оказывали действия на пролиферацию ни в отсутствие ингибиторов, ни в их присутствии. В регуляции прогестероном и соединением LS-01 экспрессии генов, связанных с факторами пролиферации, такими как PCNA, циклин D1, а также ингибитор циклин-зависимых киназ p21, необходимо участие как JNK, так и p38 MAPK. Регуляция же экспрессии гена, кодирующего Ki67, опосредуется не идентифицированным в данной работе сигнальным каскадом.

В эффекте P4 и селективных лигандов mPRs на усиление фрагментации ДНК клеток BxPC3 главным посредником сигнального каскада является p38 MAPK. На фоне ингибитора p38 MAPK действие соединений полностью сводится к нулю. Возможно, некоторую роль в этом процессе играет и JNK, но ингибирование ее активности лишь незначительно ослабляет эффекты стероидов. Изучение регуляции экспрессии генов факторов апоптоза под действием P4, LS-01 и LS-02 на фоне ингибиторов киназ показало, что JNK практически не участвует в этом процессе, тогда как p38 MAPK опосредует некоторые эффекты. Именно через p38 MAPK прогестерон снижает содержание мРНК BCL2A1, соединение LS-01 регулирует экспрессию гена *BAX*, а соединение LS-02 повышает уровень мРНК DAPK. Единственный эффект ингибитора JNK в рассматриваемых процессах заключался в дополнительной стимуляции экспрессии гена *HRK* в его присутствии под действием P4 и LS-01.

В заключение можно отметить, что P4 и соединение LS-01 действуют практически на все изучаемые процессы схожим образом. Иногда эффекты LS-01 оказываются слабее по сравнению с эффектами природного гормона – это можно объяснить более низким сродством этого соединения к mPRs в сравнении с прогестероном. Наиболее выражено влияние этих двух стероидов на процессы пролиферации и на стадии апоптоза, связанные с фрагментацией ДНК. Соединение LS-02 практически не влияет на жизнеспособность клеток, однако проявляет более активное действие на апоптотические изменения клеток, связанные с экспонированием фосфатидилсерина на наружной мембране клеток; оно также имеет другой спектр мишеней регуляции экспрессии генов. Возможно, это связано с некими временными параметрами активации рецепторов и/или сигнальных каскадов, а также с различающимся сродством этих стероидов к конкретным субтипам mPRs, α, β и γ, которое пока не изучено детально. Существенные различия в действии P4 и LS-01 от LS-02 можно объяснить разницей в их пространственной структуре. Соединение LS-02 представляет собой Δ^3-5β-прегнановый лиганд с цис-сочленением колец A и B и непланарной конформацией стероидного скаффолда, в отличие от соединения LS-01, представляющего собой 19-гидроксизамещенный 3-дезоксопрогестерон, близкий по конформации к прогестерону.

Применение селективных лигандов позволяет понять механизмы функционирования mPRs в опухолевых клетках, их роль в канцерогенезе и росте опухолевых тканей. P4 и селективные лиганды mPRs оказывают цитотоксическое действие на клетки BxPC3 аденокарциномы поджелудочной железы человека. Эти результаты позволяют предполагать, что mPRs являются перспективными мишенями при противоопухолевой терапии ряда тканей. Селективные лиганды этих рецепторов могут служить основой для разработки новых лекарственных средств, оказывающих избирательные эффекты через конкретный тип рецепторов и не влияющих на другие функции организма, опосредуе-

мые nPRs и тесно связанные с регуляцией половых циклов и процессами репродукции.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования «Геном» Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, а также ведущему научному сотруднику института И.Ю. Петрушанко за помощь в работе на проточном цитофлуориметре.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-015-00092).

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhu, Y., Bond, J., and Thomas, P. (2003) Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2237-2242, doi: 10.1073/pnas.0436133100.
2. Pang, Y., Dong, J., and Thomas, P. (2013) Characterization, neurosteroid binding and brain distribution of human membrane progesterone receptors delta and {epsilon} (mPRdelta and mPR{epsilon}) and mPRdelta involvement in neurosteroid inhibition of apoptosis, *Endocrinology*, **154**, 283-295, doi: 10.1210/en.2012-1772.
3. Щелкунова Т. А., Морозов И. А. (2015) Молекулярные основы и тканевая специфичность действия прогестинов. Обзор, *Молекуляр.биология*, **49**, 728-748, doi: 10.7868/S0026898415050158.
4. Diep, C. H., Daniel, A. R., Mauro, L. J., Knutson, T. P., and Lange, C. A. (2015) Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers, *J. Mol. Endocrinol.*, **54**, R31-53, doi: 10.1530/jme-14-0252.
5. Dressing, G. E., Alyea, R., Pang, Y., and Thomas, P. (2012) Membrane progesterone receptors (mPRs) mediate progestin induced antimorbidity in breast cancer cells and are expressed in human breast tumors, *Horm. Cancer*, **3**, 101-112, doi: 10.1007/s12672-012-0106-x.
6. Wu, X., Sun, L., Wang, X., Su, P., Li, Z., et al. (2016) Breast cancer invasion and metastasis by mPRα through the PI3K/Akt signaling pathway, *Pathol. Oncol. Res.*, **22** , 471-476, doi: 10.1007/s12253-015-0023-8.
7. Vares, G., Sai, S., Wang, B., Fujimori, A., Nenoi, M., and Nakajima, T. (2015) Progesterone generates cancer stem cells through membrane progesterone receptor-triggered signaling in basal-like human mammary cells, *Cancer Lett.*, **362**, 167-173, doi: 10.1016/j.canlet.2015.03.030.
8. Zuo, L., Li, W., and You, S. (2010) Progesterone reverses the mesenchymal phenotypes of basal phenotype breast cancer cells via a membrane progesterone receptor mediated pathway, *Breast Cancer Res.*, **12**, R34, doi: 10.1186/bcr2588.
9. Zhou, L., Zhou, W., Zhang, H., Hu, Y., Yu, L., et al. (2017) Progesterone suppresses triple-negative breast cancer growth and metastasis to the brain via membrane progesterone receptor α, *Int. J. Mol. Med.*, **40**, 755-761, doi: 10.3892/ijmm.2017.3060.
10. Gonzalez-Orozcoa, J. C., Hansberg-Pastorb, V., Valadez-Cosmesa, P., Nicolas-Ortegaa, W., Bastida-Beristaina, Y., et al. (2018) Activation of membrane progesterone receptor-alpha increases proliferation, migration, and invasion of human glioblastoma cells, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **477**, 81-89, doi: 10.1016/j.mce.2018.06.004.
11. Charles, N. J., Thomas, P., and Lange, C. A. (2010) Expression of membrane progesterone receptors (mPR/PAQR) in ovarian cancer cells: implications for progesterone induced signaling events, *Horm. Cancer*, **1**, 167-176, doi: 10.1007/s12672-010-0023-9.
12. Xiao, J., Chen, X., Lu, X., Xie, M., He, B., et al. (2020) Progesterone/Org inhibits lung adenocarcinoma cell growth via membrane progesterone receptor alpha, *Thorac. Cancer*, **11**, 2209-2223, doi: 10.1111/1759-7714.13528.
13. Goncharov, A. I., Maslakova, A. A., Polikarpova, A. V., Bulanova, E. A., Guseva, A. A., et al. (2017) Progesterone inhibits proliferation and modulates expression of proliferation-Related genes in classical progesterone receptor-negative human BxPC3 pancreatic adenocarcinoma cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **165**, 293-304, doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.07.007.
14. Polikarpova, A. V., Maslakova, A. A., Levina, I. S., Kulikova, L. E., Kuznetsov, Y. V., et al. (2017) Selection of progesterone derivatives specific to membrane progesterone receptors, *Biochemistry (Mosc.)*, **82**, 140-148, doi: 10.1134/S0006297917020055.
15. Levina, I. S., Kuznetsov, Y. V., Shchelkunova, T. A., and Zavarzin, I. V. (2021) Selective ligands of membrane progesterone receptors as a key to studying their biological functions *in vitro* and *in vivo*, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **207**, 105827, doi: 10.1016/j.jsbmb.2021.105827.
16. Polikarpova, A. V., Levina, I.S., Sigai, N. V., Zavarzin, I. V., Morozov, I. A., et al. (2019) Immunomodulatory effects of progesterone and selective ligands of membrane progesterone receptors, *Steroids*, **145**, 5-18, doi: 10.1016/j.steroids.2019.02.009.
17. Kasubuchi, M., Watanabe, K., Hirano, K., Inoue, D., Li, X., et al. (2017) Membrane progesterone receptor beta (mPRβ/Paqr8) promotes progesterone-dependent neurite outgrowth in PC12 neuronal cells via non-G protein-coupled receptor (GPCR) signaling, *Sci. Rep.*, **7**, 5168, doi: 10.1038/s41598-017-05423-9.
18. Pang, Y., Dong, J., and Thomas, P. (2015) Progesterone increases nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells through activation of membrane progesterone receptor α, *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **308**, E899-911, doi: 10.1152/ajpendo.00527.2014.
19. Pang, Y., and Thomas, P. (2018) Progesterone induces relaxation of human umbilical cord vascular smooth muscle cells through mPRa (PAQR7), *Mol. Cell. Endocrinol.*, **474**, 20-34, doi: 10.1016/j.mce.2018.02.003.
20. Castelnovo, L. F., Caffino, L., Bonalume, V., Fumagalli, F., Thomas, P., and Magnaghi, V. (2020) Membrane progesterone receptors (mPRs/PAQRs) differently regulate migration, proliferation, and differentiation in rat schwann cells, *J. Mol. Neurosci.*, **70**, 433-448, doi: 10.1007/s12031-019-01433-6.
21. Kong, X., Li, M., Shao, K., Yang, Y., Wang, Q., and Cai, M. (2020) Progesterone induces cell apoptosis via the CACNA2D3/Ca^{2+}/p38 MAPK pathway in endometrial cancer, *Oncol. Rep.*, **43**, 121-132, doi: 10.3892/or.2019.7396.
22. Godbole, M., Tiwary, K., Badwe, R., Gupta, S., and Dutt, A. (2017) Progesterone suppresses the invasion and

migration of breast cancer cells irrespective of their progesterone receptor status, *Cell Oncol. (Dordr)*, **40**, 411-417, doi: 10.1007/s13402-017-0330-z.
23. Salazar, M., Lerma-Ortiz, A., Hooks, G. M., Ashley, A. K., and Ashley, R. L. (2016) Progestin-mediated activation of MAPK and AKT in nuclear progesterone receptor negative breast epithelial cells: The role of membrane progesterone receptors, *Gene*, **591**, 6-13, doi: 10.1016/j.gene.2016.06.044.
24. Karteris, E., Zervou, S., Pang, Y., Dong, J., Hillhouse, E. W., et al. (2006) Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term, *Mol. Endocrinol.*, **20**, 1519-1534, doi: 10.1210/me.2005-0243.
25. Lu, J., Reese, J., Zhou, Y., and Hirsch, E. (2015) Progesterone-induced activation of membrane-bound progesterone receptors in murine macrophage cells, *J. Endocrinol.*, **224**, 183-194, doi: 10.1530/JOE-14-0470.
26. Camilletti, M. A., Ferraris, J., Abeledo-Machado, A., Converse, A., Faraoni, E. Y., et al. (2018) Participation of membrane progesterone receptor α in the inhibitory effect of progesterone on prolactin secretion, *J. Neuroendocrinol.*, **30**, e12614, doi: 10.1111/jne.12614.
27. Thomas, P., Pang, Y., Dong, J., Groenen, P., Kelder, J., et al. (2007) Steroid and g protein binding characteristics of the seatrout and human progestin membrane receptor subtypes α and their evolutionary origins, *Endocrinology*, **148**, 705-718, doi: 10.1210/en.2006-0974.
28. Tokumoto, T., Hossain, M. B., and Wang, J. (2016) Establishment of procedures for studying mPR-interacting agents and physiological roles of mPR, *Steroids*, **111**, 79-83, doi: 10.1016/j.steroids.2016.02.015.
29. Tang, Y. T., Hu, T., Arterburn, M., Boyle, B., Bright, J. M., et al. (2005) PAQR Proteins: a novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif, *J. Mol. Evol.*, **61**, 372-380, doi: 10.1007/s00239-004-0375-2.
30. Nader, N., Dib, M., Hodeify, R., Courjaret, R., Elmi, A., et al. (2020) Membrane progesterone receptor induces meiosis in *Xenopus oocytes* through endocytosis into signaling endosomes and interaction with APPL1 and Akt2, *PLoS Biol.*, **19**, e3001117, doi: 10.1371/journal.pbio.3000901.
31. Fernandes, M. S., Brosens, J. J., and Gellersen, B. (2008) Honey, we need to talk about the membrane progestin receptors, *Steroids*, **73**, 942-52, doi: 10.1016/j.steroids.2007.12.004.
32. Atif, F., Yousuf, S., and Stein, D. G. (2015) Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multiforme: role of PI3K/Akt/mTOR signaling, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **146**, 62-73, doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.04.007.
33. Atif, F., Sayeed, I., Yousuf, S., Ishrat, T., Hua, F., et al. (2011) Progesterone inhibits the growth of human neuroblastoma: *in vitro* and *in vivo* evidence, *Mol. Med.*, **17**, 1084-1094, doi: 10.2119/molmed.2010.00255.
34. Shchelkunova, T. A., Albert, E. A., Morozov, I. A., Rubtsov, P. M., Samokhodskaya, L. M., et al. (2011) Contents of mRNAs encoding endosome/lysosome components in normal human aorta and in stage II of atherogenesis: a hidden regulation, *Biochemistry (Mosc.)*, **76**, 1178-1184, doi: 10.1134/S0006297911100129.
35. Sui, X., Kong, N., Ye, L., Han, W., Zhou, J., et al. (2014) p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents, *Cancer Lett.*, **344**, 174-179, doi: 10.1016/j.canlet.2013.11.019.

CYTOTOXIC EFFECTS OF THE SELECTIVE LIGANDS OF MEMBRANE PROGESTERONE RECEPTORS IN HUMAN PANCREATIC ADENOCARCINOMA CELLS BxPC3

A. I. Goncharov[1], I. S. Levina[2], V. L. Shliapina[1], I. A. Morozov[3], P. M. Rubtsov[3], I. V. Zavarzin[2], O. V. Smirnova[1], and T. A. Shchelkunova[1]*

[1] *Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty, 119991 Moscow, Russia; E-mail: Schelkunova-t@mail.ru*

[2] *Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia*

[3] *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia*

Progesterone and its synthetic analogues act on cells through different types of receptors, affecting proliferation and apoptosis. These compounds exert their effect through the nuclear receptors and the insufficiently studied membrane progesterone receptors (mPRs) belonging to the progestin and adiponectin Q receptor (PAQR) family. We have identified two selective ligands of mPRs that activate only this type of progesterone receptors – 19-hydroxypregn-4-en-20-one (LS-01) and 19-hydroxy-5β-pregn-3-en-20-one (LS-02). The goal of this work is to study the effect of these compounds on proliferation and death of human pancreatic adenocarcinoma cells BxPC3 and involvement of the two kinases (p38 MAPK and JNK) in signaling pathways activated by progestins through mPRs. It was shown that progesterone and the compound LS-01 significantly ($p < 0.05$) inhibited the BxPC3 cell viability, with JNK serving as a mediator. The identified targets of these two steroids are the genes of the proteins Ki67, cyclin D1, PCNA, and p21. Progesterone and the compound LS-01 significantly ($p < 0.05$) stimulate DNA fragmentation, enhancing the cell death. The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a key mediator of this process. The BCL2A1 protein gene was identified as a target of both steroids. The compound LS-02 significantly ($p < 0.05$) alters membrane permeability and changes the exposure of phosphatidylserine on the outer membrane leaflet, also enhancing the cell death. This compound acts on these processes by activating both kinases, JNK and p38 MAPK. The compound LS-02 targets the genes encoding the proteins HRK, caspase 9, and DAPK.

Keywords: progesterone, selective ligands, proliferation, apoptosis, expression, nuclear receptor, membrane progesterone receptors