

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ПРОГЕСТЕРОНА И СЕЛЕКТИВНЫХ ЛИГАНДОВ МЕМБРАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ ПРОГЕСТЕРОНА В КЛЕТКАХ HepG2 ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 Т.А. Щелкунова^{1*}, И.С. Левина², И.А. Морозов³, П.М. Рубцов³,
А.И. Гончаров¹, Ю.В. Кузнецов², И.В. Заварзин², О.В. Смирнова¹

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

² Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 117913 Москва, Россия

³ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 117913 Москва, Россия

Поступила в редакцию 02.12.2022

После доработки 13.09.2023

Принята к публикации 22.09.2023

Прогестерон оказывает множественные эффекты в разных тканях через ядерные рецепторы (nPR) и через мембранные рецепторы семейства адипонектиновых и прогестинных рецепторов (mPR). Через разные типы рецепторов действие прогестерона на клетки может значительно различаться. При этом он влияет на процессы пролиферации и апоптоза в нормальных и опухолевых тканях двойственно: стимулируя пролиферацию и канцерогенез в одних тканях, подавляя их и стимулируя гибель клеток — в других. В данной работе мы показали наличие высокого уровня мРНК и белка mPR β в опухолевых клетках HepG2 гепатоцеллюлярной карциномы человека. Экспрессия других мембранных и классических ядерных рецепторов не была обнаружена. Можно предположить, что mPR β выполняет важную функцию в клетках HepG2. Главной целью работы явилось изучение функции этого белка и механизмов его действия в клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека. Ранее нами были выявлены селективные лиганды mPR — соединения LS-01 и LS-02, не взаимодействующие с ядерными рецепторами. Их применение позволяет дифференцировать эффекты прогестина, опосредуемые разными типами рецепторов. В работе изучалось действие прогестерона, LS-01 и LS-02 на пролиферацию и гибель клеток HepG2, а также активирующее фосфорилирование двух киназ, p38 MAPK и JNK, под действием трех стероидов. Показано, что все три прогестина через 72 ч инкубации с клетками подавляли их жизнеспособность и стимулировали появление фосфатидилсерина на наружной поверхности мембран, выявляемое по связыванию с аннексином V, но они не влияли на фрагментацию ДНК ядер клеток. Прогестерон достоверно снижал экспрессию генов маркеров пролиферации и стимулировал экспрессию гена белка p21, но на экспрессию генов некоторых проапоптотических факторов действовал подавляюще. Все три стероида активировали JNK в этих клетках, но на активность p38 MAPK действия не оказывали. Эффекты прогестерона и селективных лигандов mPR в клетках HepG2 были одинаковыми в отношении подавления пролиферации и стимуляции апоптотических изменений в наружных мембранах, следовательно, они осуществлялись через взаимодействие с mPR β . Участником сигнального каскада, активируемого в этих клетках изучаемыми стероидами, является JNK.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: прогестерон, селективные лиганды мембранных рецепторов прогестерона, пролиферация, апоптоз, ядерный рецептор прогестерона, мембранный β -рецептор прогестерона, клеточная линия HepG2 гепатоцеллюлярной карциномы человека.

DOI: 10.31857/S0320972523110210, EDN: MNJPKA

ВВЕДЕНИЕ

Наиболее изученной функцией прогестерона является его действие на репродуктивные

процессы в женском организме. Значительно менее исследованы его эффекты на ткани и органы нерепродуктивной сферы. Однако показано влияние прогестерона и его синтети-

Принятые сокращения: ВхРС3 — линия клеток аденокарциномы поджелудочной железы человека; HepG2 — линия клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека; nPR и mPR — ядерные и мембранные рецепторы прогестерона; PI — йодид пропидия.

* Адресат для корреспонденции.

ческих аналогов на процессы пролиферации, гибели клеток и канцерогенез в целом ряде изученных тканей [1]. Такое влияние прогестина часто бывает разнонаправленным: стимулирующим или ингибирующим в зависимости от состава рецепторов прогестерона и фенотипа конкретной клетки [2–4]. Действие прогестерона обусловлено активацией его ядерных рецепторов (nPR) и мембранных рецепторов семейства адипонектиновых и прогестиновых рецепторов пяти субтипов (mPRs). Из последних наиболее широко представлены в тканях субтипы mPR α , mPR β и mPR γ . Участие ядерных рецепторов в процессах репродукции у особей женского пола, в поведенческих реакциях, а также в функционировании некоторых тканей и органов нерепродуктивной сферы и опухолевых клетках изучается с конца 60-х гг. прошлого века [5]. Мембранные рецепторы изучаются последние 20 лет [6–8]. Много работ посвящено исследованию различий в лигандной специфичности связывания nPR и mPRs с целью поиска для последних селективных агонистов и антагонистов [9–12], поскольку часто оба типа рецепторов обнаруживаются одновременно в одних и тех же клетках. Функция mPRs в разных тканях, а также их роль в процессе канцерогенеза остаются под вопросом. Мы изучили экспрессию генов разных типов рецепторов прогестерона более чем в 16 опухолевых культурах и выявили клеточную линию VxPC3 аденокарциномы поджелудочной железы человека с максимальной экспрессией mPR α и mPR γ , низкой экспрессией mPR β и отсутствием nPR [13]. В клетках VxPC3 мы изучили связывание прогестерона и его производных, синтезированных в ИОХ имени Н.В. Зелинского, и обнаружили 2 соединения, взаимодействующие с mPRs, но не имеющие сродства к nPR [14, 15]. Эффекты этих новых селективных лигандов мембранных рецепторов прогестерона — LS-01 (19-гидроксипрегн-4-ен-20-он) и LS-02 (19-гидрокси-5 β -прегн-3-ен-20-он) — были изучены в опухолевых клетках VxPC3 [16]. В них обнаружилось цитотоксическое действие изучаемых соединений, причем эффекты LS-02 значительно отличались от действия прогестерона и LS-01. В данной работе мы нашли еще одну культуру клеток, в которой также не обнаруживались nPR, но наблюдалась высокая экспрессия гена *PAQR8* мембранного β -рецептора прогестерона. Это культура клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2. Уровень мРНК белка mPR β в клетках HepG2 значительно превосходил уровень мРНК этого белка в других изученных нами 16 опухолевых

линиях клеток человека [13]. Можно предположить, что данный рецептор принимает важное участие в регуляции функций этих клеток. Функции субтипа β мембранных рецепторов и сигнальные пути, активируемые через него прогестероном, изучены мало в сравнении с субтипом mPR α . В нейрональных клетках PC12 его функция связана с ростом аксонов, а сигнальный путь включает фосфорилирование ERK [17], в миометрии активация этого рецептора, наряду с mPR α , приводит к фосфорилированию легких цепей миозина и усилению сократительной активности, при этом показана активация p38 MAPK, но не ERK1/2 [18], экспрессия mPR β в клетках рака эндометрия связана с благоприятным прогнозом в течение заболевания [19]. Главной целью данной работы было выяснение функции mPR β в клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 и изучение сигнальных каскадов, активируемых при его взаимодействии с прогестинами. Для подтверждения участия mPR β в исследуемых эффектах мы использовали выявленные нами селективные лиганды mPRs. В работе исследовалось действие прогестерона, LS-01 и LS-02 на пролиферацию и гибель опухолевых клеток HepG2, а также на активирующее фосфорилирование двух киназ — возможных посредников действия этих стероидов. Изучалось влияние трех стероидов на жизнеспособность клеток с помощью ХТТ-теста, на процесс апоптоза и некроза путем изучения фрагментации ядерной ДНК, экспонирования на наружной мембране клеток фосфатидилсерина, проницаемости к йодиду пропидия. Также исследовалось действие прогестерона и селективных лигандов его мембранных рецепторов на экспрессию генов белков, связанных с процессами пролиферации и апоптоза, и возможность участия p38 MAPK и JNK в сигнальных путях, активируемых рецептором при взаимодействии с гормонами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В исследованиях использовали следующие реактивы: среда DMEM с феноловым красным, раствор Версена, 100 $\times$ L-глутамин, 0,05%-ный раствор трипсина-ЭДТА в сбалансированном солевом растворе Хэнка («ПанЭко», Россия); фетальная бычья сыворотка (FBS) и фетальная бычья сыворотка, обработанная декстран-покрытым углем (DFBS) («HyClone», США); 100 $\times$ смесь антибиотиков (пенициллин, стрептомицин) и антимикотиков, среда DMEM без фенолового

красного («Gibco», США); прогестерон («Sigma-Aldrich Corporation», США); реагенты для иммуноблоттинга и электрофореза («Thermo Scientific», США и «GE Healthcare», Великобритания); антитела козы к IgG (H + L) кролика и антитела козы к IgG (H + L) мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена HRP («Wuhan Elabscience Biotechnology», Китай); 19-гидроксипрегн-4-ен-20-он (LS-01) и 19-гидроксипрегн-3-ен-20-он (LS-02) были синтезированы в ИОХ имени Н.Д. Зелинского [14, 15].

Культивирование клеток и обработка гормонами. Клетки HepG2 гепатоцеллюлярной карциномы человека («ATCC», США) культивировали в среде DMEM с феноловым красным, содержащей 10% FBS, 0,365 г/литр глутамина и раствор смеси антибиотика и антимикотика, в стандартных условиях при 37 °C в инкубаторе в атмосфере 5% CO₂. После третьего пассажа клетки рассеивали в среду DMEM без фенолового красного, содержащую 10% DFBS и раствор антибиотиков. После трех пассажей в среде без стероидов клетки рассаживали в планшеты или чашки Петри, растили до 50–70% конфлюэнтности и обрабатывали гормонами или растворителем – этанолом (не больше 0,2% v/v) в течение 24–72 ч. Затем культуральную среду удаляли, клетки использовались для анализов. В разных анализах использовались концентрации стероидов от 10 нМ до 20 мкМ. Высокие концентрации позволяют лучше выявить эффект, поскольку сродство прогестерона к mPRs в 5–30 раз ниже, чем его сродство к pPR [13, 14]. По-видимому, активация mPRs происходит при беременности и вблизи мест синтеза прогестерона, где локально наблюдаются концентрации этого гормона в 10–100 раз выше, чем в кровеносном русле [20]. В экспериментальных условиях подобные концентрации наблюдались в сыворотке животных при дополнительном введении стероида, но выживаемость, активность и прибавка веса у таких животных сохранялись неизменными в сравнении с контрольными животными [21].

ХТТ-тест. Клетки HepG2 рассеивали в 96-луночный планшет («Corning», США) по $(5-6) \times 10^3$ клеток на лунку. На следующий день проводили замену среды на среду с прогестероном или одним из селективных лигандов в разных концентрациях. После окончания инкубации проводили ХТТ-тест с помощью набора Cell Proliferation Kit («Biological Industries», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Измерение поглощения в лунках проводили через час и через 2 ч при 450 и 620 нм на планшетном спектро-

фотометре Multiscan EX («Thermo electron corporation», США).

TUNEL-анализ. Клетки HepG2 рассеивали в 6-луночные планшеты («Corning») по $(5-7) \times 10^5$ клеток на лунку. На следующий день среду в лунках заменяли на среду с прогестероном, LS-01 или LS-02 в разных концентрациях. После инкубации клетки снимали раствором трипсина, промывали, фиксировали в 1%-ном (w/v) растворе параформальдегида в течение 15 мин на льду, промывали физиологическим раствором на фосфатном буфере (PBS) и заливали 70%-ным этанолом, после чего оставляли на ночь при –20 °C. На следующий день проводили анализ TUNEL с помощью набора APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit, with Alexa Fluor® 488 Anti-BrdU («Invitrogen», A23210) в соответствии с инструкцией производителя. Клетки промывали, инкубировали в течение ночи при комнатной температуре в растворе, содержащем BrdUTP, терминальную дезоксирибонуклеотидилтрансферазу, реакционный буфер. После инкубации клетки отмывали промывочным буфером и обрабатывали час в темноте антителами Alexa Fluor™ 488 dye-labeled anti-BrdU, разведенными в 20 раз. Затем в пробирки добавляли буфер с йодистым пропидием и РНКазой А, через 30 мин измерялось количество клеток, провзаимодействовавших с мечеными антителами, на LSR Fortessa («BD Biosciences», США) методом проточной цитометрии.

Окраска конъюгатом аннексина V. Клетки рассеивали на 24-луночный планшет по 7×10^4 клеток на лунку. На следующий день клетки обрабатывали гормонами. После инкубации клетки снимали раствором трипсина, промывали холодным PBS и определяли апоптотические и некротические клетки с использованием набора Annexin V-FITC conjugate («Invitrogen», A13199). Апоптотическую и некротическую гибель клеток анализировали с помощью двойного окрашивания с аннексином V и йодидом пропидия (PI). Аннексин V связывается с апоптотическими клетками с экспонированным фосфатидилсерином, в то время как PI метит клетки с повреждением мембраны. Окрашивание производили согласно рекомендациям производителя, как было описано ранее [16]. Процент апоптотических и некротических клеток определяли проточной цитофлуориметрией на каналах «FITC» и «PerCP-cy5-5 A» на приборе LSR Fortessa.

Определение экспрессии генов. После обработки клеток HepG2 гормонами из лунок удаляли культуральную среду, из клеток выделяли общую РНК, используя TRIzol («Invitrogen»).

Синтез кДНК проводили с помощью набора ImProm-II™ Reverse Transcription System («Promega»), согласно инструкции производителя. ПЦР в реальном времени проводили на приборе LightCycler 96 («Roche», Германия) с использованием реагентов, включающих интеркалирующий краситель SYBR Green I («Синтол», Россия). Используемые для ПЦР специфические праймеры приведены в таблице в Приложении. Праймеры подбирались с учетом экзон-интронной структуры генов так, чтобы не образовывалось ампликонов на геномной ДНК в выбранных условиях ПЦР. В случае, когда ген имел только один экзон, препарат РНК перед синтезом кДНК обрабатывали RQ1 RNase-Free DNase («Promega»). Были использованы следующие условия амплификации: инкубация при 95 °С – 5 мин; далее 40 циклов: 95 °С – 10 с, 58 °С – 15 с, 72 °С – 20 с; плавление 72–95 °С. Каждый образец анализировали в трех повторах. Уровень экспрессии мРНК изучаемых генов нормировался на уровень мРНК референсного гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*), а затем – на контрольный образец для относительного количественного определения с использованием метода $\Delta\Delta C_t$ [16].

Иммуноблоттинг. Для определения рецепторов клетки HepG2 лизировали с помощью реагента CellLytic™ M («Sigma-Aldrich Corporation») с добавлением ингибитора MS-SAFE Protease and Phosphatase inhibitor («Sigma-Aldrich Corporation»). Белки прогревали в буфере с SDS и разделяли в 13,5%-ном ПААГ, переносили на мембраны («GE Healthcare Life Sciences», США и «Amersham», Германия), которые обрабатывали 60 мин раствором PBS-T (PBS и 0,1% (v/v) Tween 20), содержащим 5% блокирующего агента (ECL Advance Blocking Agent, «GE Healthcare Life Sciences»). Затем мембраны инкубировали с антителами к mPR α (ab75508), к mPR β (ab123693) и к mPR γ (ab79517) («Abcam», США), разведенными соответственно в 500, 100 и 500 раз. Инкубацию проводили в течение ночи, затем мембраны промывали и обрабатывали (60 мин) вторичными антителами козы к IgG (H + L) кролика в разведении 10 000, после чего промывали PBS-T. Хемилюминесценцию измеряли на приборе ChemiDoc MP system («Bio-Rad», США) с использованием реагента ECL SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate («Thermo Scientific»). Для повторного использования мембраны обрабатывали в соответствии с протоколом «Western blot membrane stripping for restaining protocol» («Abcam») и инкубировали с антителами

Anti-GAPDH antibody G9545 («Sigma-Aldrich Corporation») с повторением описанной выше процедуры.

Для определения активирующего фосфорилирования киназ под действием гормонов клетки подвергали воздействию прогестерона и селективных лигандов mPRs в концентрации 20 мкМ в течение 40 мин. Далее их лизировали в реагенте, описанном ранее. Белки перед нанесением на 13,5%-ный ПААГ прогревали при 50 °С 15 мин, разделяли электрофорезом и переносили на мембраны. После обработки блокирующим раствором, содержащим 5% блокирующего агента на TBST (физиологический раствор на основе Tris-буфера, содержащий 0,1% (v/v) Tween 20), мембраны инкубировали с первичными антителами либо к активированным изоформам JNK (monoclonal anti-JNK, activated (diphosphorylated JNK), J4750), либо ко всем изоформам JNK (Anti-JNK antibody, SAB4200176), либо к фосфо-p38 MAPK [Phospho-p38 MAPK (Thr180, Tyr182), S.417.1, («Invitrogen»), либо к p38 MAPK (Anti-p38 MAPK antibody SAB4500490)] при 4 °С в течение ночи. Затем мембраны промывали TBST, инкубировали (60 мин) со вторичными антителами козы к IgG (H + L) кролика или мыши в разведении 10 000, опять промывали TBST и измеряли хемилюминесценцию на приборе ChemiDoc MP system.

Статистическая обработка результатов. Статистический обсчет данных проводился в программе GraphPad Prism 6.01 («GraphPad Software», США). Результаты измерений на гистограммах даны как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Оценку проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с поправкой на множественные сравнения Даннетта. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия рецепторов прогестерона в клетках HepG2 гепатоцеллюлярной карциномы человека. В клетках HepG2 была изучена экспрессия генов *PGR* ядерных рецепторов прогестерона и *PAQR 7*, *PAQR 8* и *PAQR 5* трех мембранных рецепторов: mPR α , mPR β , mPR γ . Результаты экспериментов представлены на рис. 1, а. Средние значения уровня мРНК *PAQR 7* (mPR α) составляли 23% от уровня мРНК референсного гена *GAPDH*, мРНК *PAQR 8* (mPR β) – 579%, мРНК *PAQR 5* (mPR γ) – 17%, мРНК *PGR* (nPR) практически не выявлялась. Таким образом, в клетках HepG2 преимущественно экспресси-

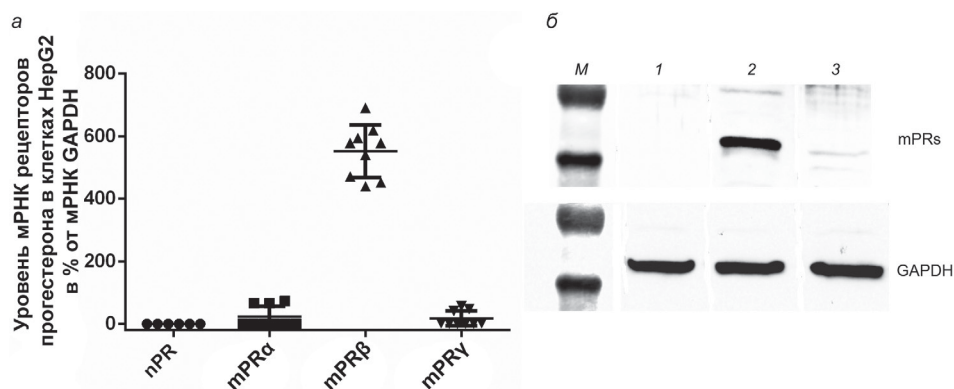


Рис. 1. Изучение экспрессии генов и содержания белков, рецепторов прогестерона, в HepG2-клетках. *а* – Содержание мРНК *PGR* (nPR) и мРНК *PAQR* 7, *PAQR* 8 и *PAQR* 5 (mPRα, mPRβ, mPRγ) в клетках HepG2 в процентах от мРНК *GAPDH*. *б* – Иммуноблоттинг лизатов клеток HepG2 после инкубации: 1 – с первичными антителами (АТ) к mPRα, 2 – с первичными АТ к mPRβ, 3 – с первичными АТ к mPRγ и АТ к референсному белку (*GAPDH*). mPRs – 40 кДа; *GAPDH* – 36 кДа; *M* – маркеры 50 кДа и 34 кДа

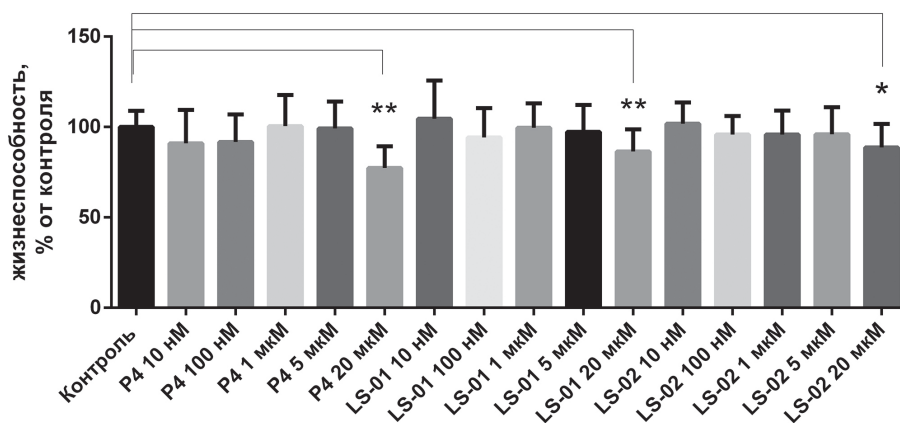


Рис. 2. Действие разных концентраций прогестерона (P4) и селективных лигандов LS-01 и LS-02 на жизнеспособность клеток HepG2, определенную с помощью теста ХТТ. Результаты измерений представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Отмечено достоверное отличие от контрольных значений: * $p = 0,0011$; ** $p < 0,0001$

руется субтип mPRβ. Результаты иммуноблоттинга, приведенные на рис. 1, б, подтверждают этот вывод.

Действие прогестерона и селективных лигандов mPRs на жизнеспособность клеток HepG2 в ХТТ-тесте. Клетки HepG2 были обработаны прогестероном и селективными лигандами в течение 24, 48 и 72 ч. В экспериментах с инкубацией 24 и 48 ч достоверного эффекта гормонов выявлено не было (данные не представлены). На рис. 2 продемонстрированы результаты статистической обработки ХТТ-теста шести независимых экспериментов: прогестерон (P4) снижал жизнеспособность клеток HepG2 на 23% ($p < 0,0001$), LS-01 – на 14% ($p < 0,0001$), LS-02 – на 12% ($p = 0,0011$) при концентрациях 20 мкМ через 72 ч инкубации с гормонами.

Действие прогестерона и селективных лигандов mPRs на фрагментацию ДНК клеток HepG2 в TUNEL-тесте. В работе изучалось действие трех стероидов на фрагментацию ДНК.

На рис. 3 представлена гистограмма статистического обобщения результатов экспериментов исследования клеток с фрагментацией ДНК методом TUNEL-анализа. Можно видеть, что через 72 ч инкубации достоверных эффектов гормонов в сравнении с контролем не обнаружено (по результатам 7 независимых экспериментов).

Эффект прогестерона и селективных лигандов LS-01 и LS-02 на связывание клетками HepG2 аннексина V и проницаемость к йодиду пропидия. Через 72 ч инкубации прогестерон достоверно вызывал повышение связывания аннексина V клетками HepG2, но при этом снижал количество клеток, проницаемых для PI (рис. 4 и 5). Селективные лиганды обладали таким же, но менее выраженным действием (рис. 5 и 6). В сравнении с контролем количество всех клеток, которые связывали аннексин V, в присутствии 5 мкМ прогестерона увеличивалось в 2 раза ($p = 0,044$), в присутствии 20 мкМ – в 4,5 раза ($p < 0,0001$).

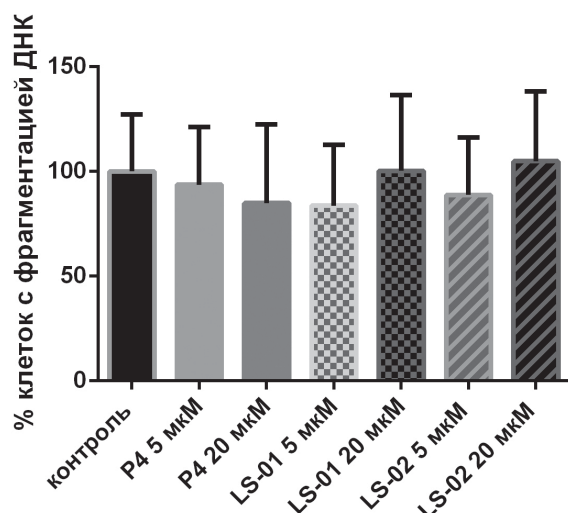


Рис. 3. Действие прогестерона (P4) и селективных лигандов LS-01 и LS-02 на фрагментацию ДНК клеток HepG2, определенную с помощью TUNEL-теста. Результаты измерений представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение

LS-01 в концентрации 5 мкМ повышал количество таких клеток в 1,3 раза, в концентрации 20 мкМ — в 2,2 раза ($p = 0,0136$). LS-02 в концентрации 5 мкМ повышал количество таких клеток в 1,2 раза, в концентрации 20 мкМ — в 2,2 раза ($p < 0,0001$) (рис. 5, а). Среди всех

клеток, связывающих аннексин V, под действием прогестерона увеличивалось количество тех из них, которые были непроницаемы для PI (рис. 5, б), при 5 мкМ — в 2,7 раза и при 20 мкМ — в 15 раз ($p < 0,0001$); а тех, которые одновременно связывали аннексин V и были проницаемы для PI (рис. 5, в), при 5 мкМ — в 1,9 раза ($p = 0,0005$) и при 20 мкМ — в 3,2 раза ($p < 0,0001$). Под действием LS-01 среди всех клеток, связывающих аннексин V, увеличивалось количество тех из них, которые были непроницаемы для PI (рис. 5, б), при 5 мкМ — в 1,9 раза и при 20 мкМ — в 3,5 раза ($p = 0,0302$); а тех, которые одновременно связывали аннексин V и были проницаемы для PI (рис. 5, в), при 5 мкМ — в 1,3 раза и при 20 мкМ — в 2 раза ($p = 0,0002$). Наконец, под действием LS-02 среди всех клеток, связывающих аннексин V, увеличивалось количество тех из них, которые были непроницаемы для PI, при 5 мкМ — в 1,4 раза и при 20 мкМ — в 3,1 раза ($p = 0,0839$); а тех, которые одновременно связывали аннексин V и были проницаемы для PI, при 5 мкМ — в 1,2 раза и при 20 мкМ — в 2,1 раза ($p < 0,0001$) (рис. 5, б и в). Наоборот, количество всех клеток, проницаемых для PI, снижалось под действием 20 мкМ прогестерона на 22% ($p = 0,0004$), под действием LS-01

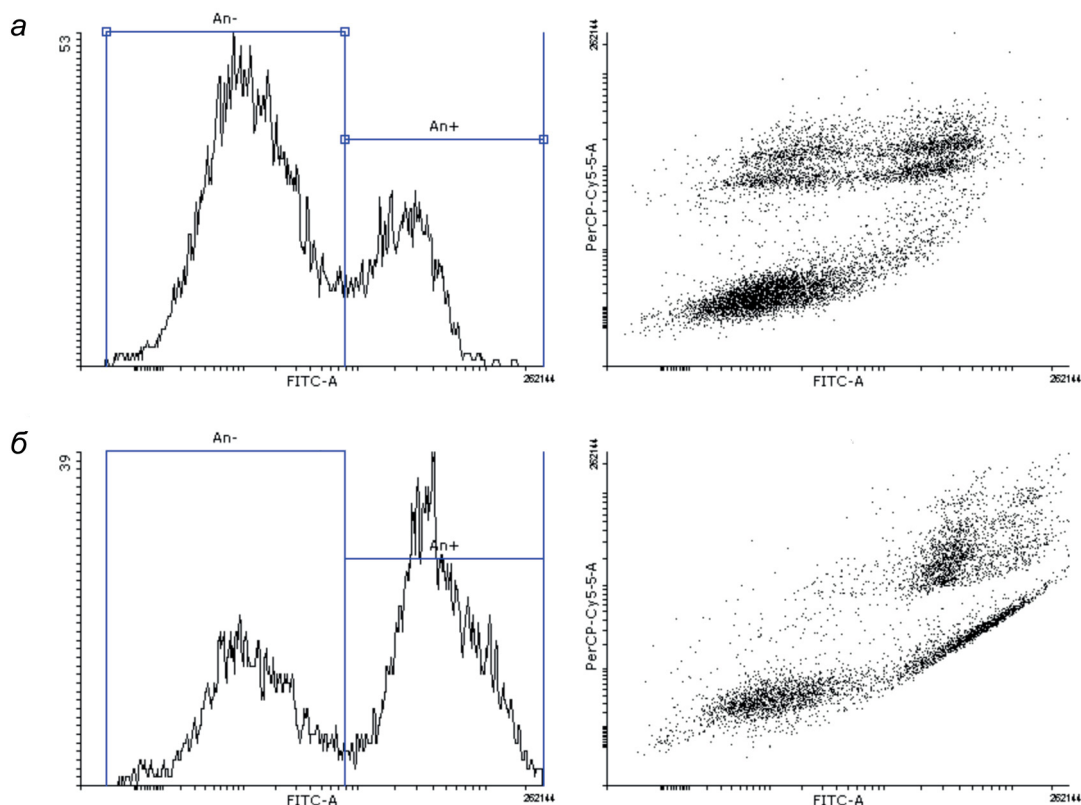


Рис. 4. Графики и точечные диаграммы распределения клеток HepG2 в эксперименте по связыванию меченого аннексина V и окраске их PI в контроле (а) и после инкубации с 20 мкМ прогестерона в течение 72 ч (б). An- — пик клеток, не взаимодействующих с аннексином V; An+ — пик клеток, связывающих аннексин V

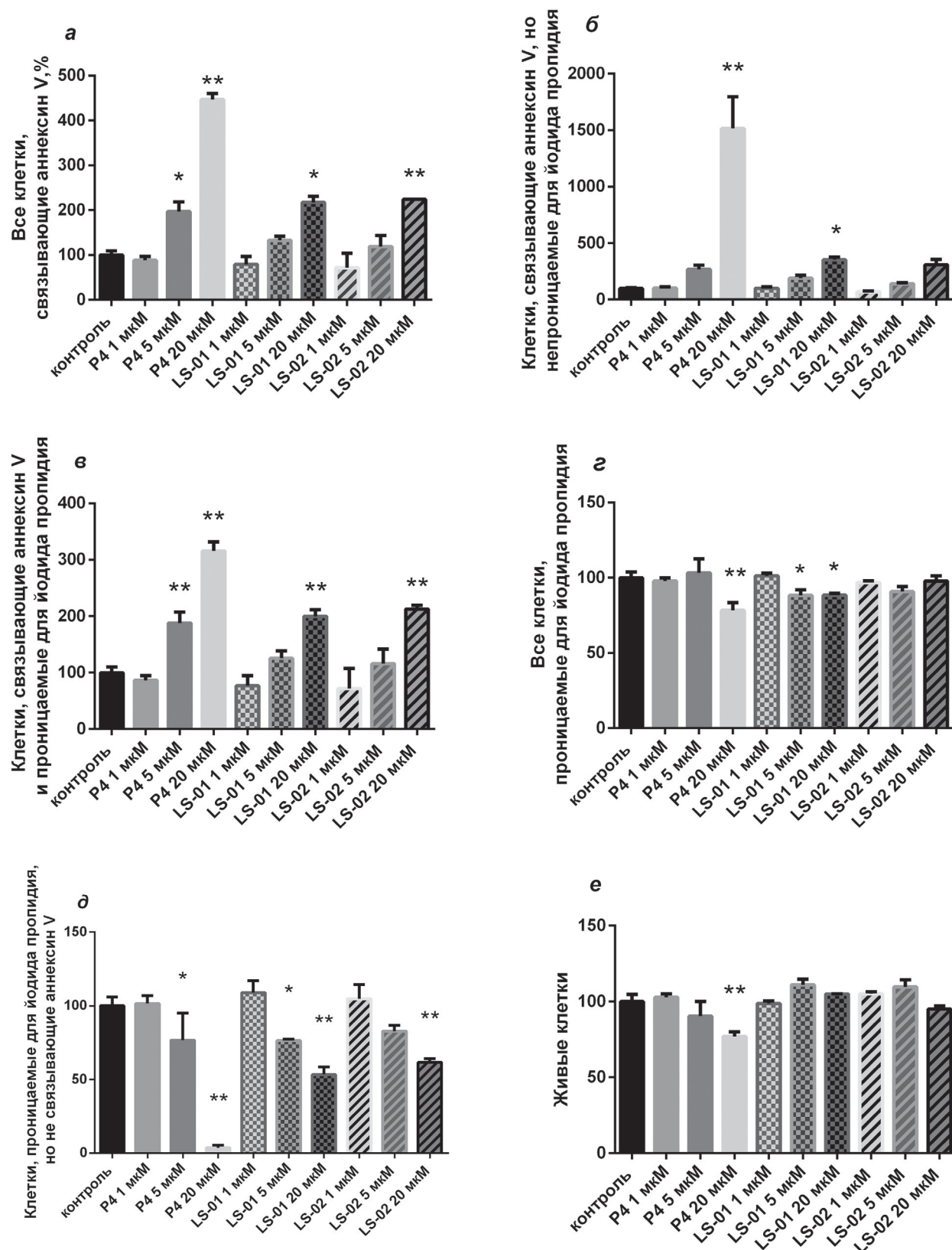


Рис. 5. Действие прогестерона (P4) и селективных лигандов LS-01 и LS-02 в разных концентрациях на все клетки, связывающие аннексин V (а); на клетки, связывающие аннексин V, но непроницаемые для PI (б); на клетки, одновременно связывающие аннексин V и проницаемые для PI (в); на все клетки, проницаемые для PI (г); на клетки, которые не связывают аннексин V, но проницаемы для PI (д); на живые, незатронутые апоптозом и некрозом клетки (е). Результаты даны в процентах от количества соответствующих клеток в контроле и представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Отмечено достоверное отличие от контрольных значений: * $0,014 \leq p \leq 0,044$; ** $p \leq 0,0005$

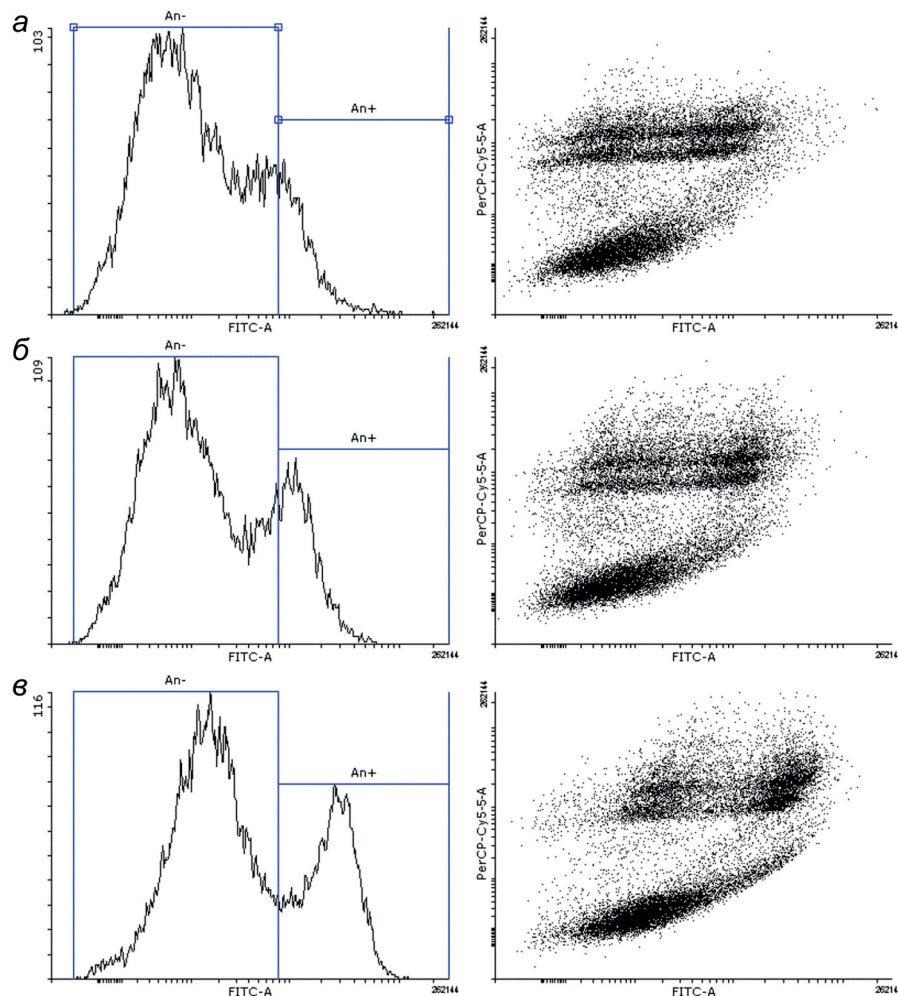


Рис. 6. Графики и точечные диаграммы распределения клеток HepG2 в эксперименте по связыванию меченого аннексина V и окраске их PI в контроле (а), после инкубации с 5 мкМ (б) и с 20 мкМ (в) LS-01 в течение 72 ч. An– — пик клеток, не взаимодействующих с аннексином V; An+ — пик клеток, связывающих аннексин V

в концентрации 5 мкМ — на 12% ($p = 0,0358$), в концентрации 20 мкМ — на 12% ($p = 0,0403$) (рис. 5, з). Такое снижение происходило за счет клеток, которые не связывали аннексин V, но были проницаемы для PI. Под действием 5 мкМ прогестерона количество таких клеток снижалось на 23% ($p = 0,0226$), под действием 20 мкМ прогестерона — на 96% ($p < 0,0001$), под действием 5 мкМ LS-01 — на 24% ($p = 0,0215$), 20 мкМ LS-01 — на 47% ($p = 0,0001$), а под действием 5 мкМ LS-02 — на 17%, 20 мкМ LS-02 — на 38% ($p = 0,0005$) (рис. 5, д). В результате количество живых, незатронутых апоптозом и некрозом клеток достоверно снижалось только под действием 20 мкМ прогестерона на 23% ($p = 0,0003$) (рис. 5, е).

Определение изменения экспрессии генов в клетках HepG2 под действием прогестерона, LS-01 и LS-02. На экспрессию генов выбранных маркеров пролиферации и факторов апоптоза достоверное влияние оказывает проге-

стерон (рис. 7). Исключением является ген, кодирующий PCNA, экспрессия которого достоверно ингибируется только LS-01 в концентрации 20 мкМ — на 18% от значений в контроле ($p = 0,0463$). Прогестерон в двух изученных концентрациях (5 и 20 мкМ) снижает уровень мРНК белка Ki67 на 67% ($p < 0,0001$) и 96% ($p < 0,0001$) соответственно, повышает мРНК белка p21 на 52% ($p = 0,0002$) и 88% ($p < 0,0001$) соответственно; в концентрации 20 мкМ прогестерон снижает уровень мРНК белка циклин D1 — на 64% ($p < 0,0001$). На экспрессию факторов апоптоза прогестерон оказывает преимущественно ингибирующее действие, за исключением гена белка HRK (Harakiri), экспрессия которого повышается в 7 раз ($p < 0,0001$) в присутствии 20 мкМ этого стероида. В этой концентрации прогестерон подавляет экспрессию проапоптотических факторов: каспазы 9 — на 33% ($p = 0,0164$), BAX — на 62% ($p < 0,0001$), BAD — на 31% ($p = 0,0001$). Снижение экс-

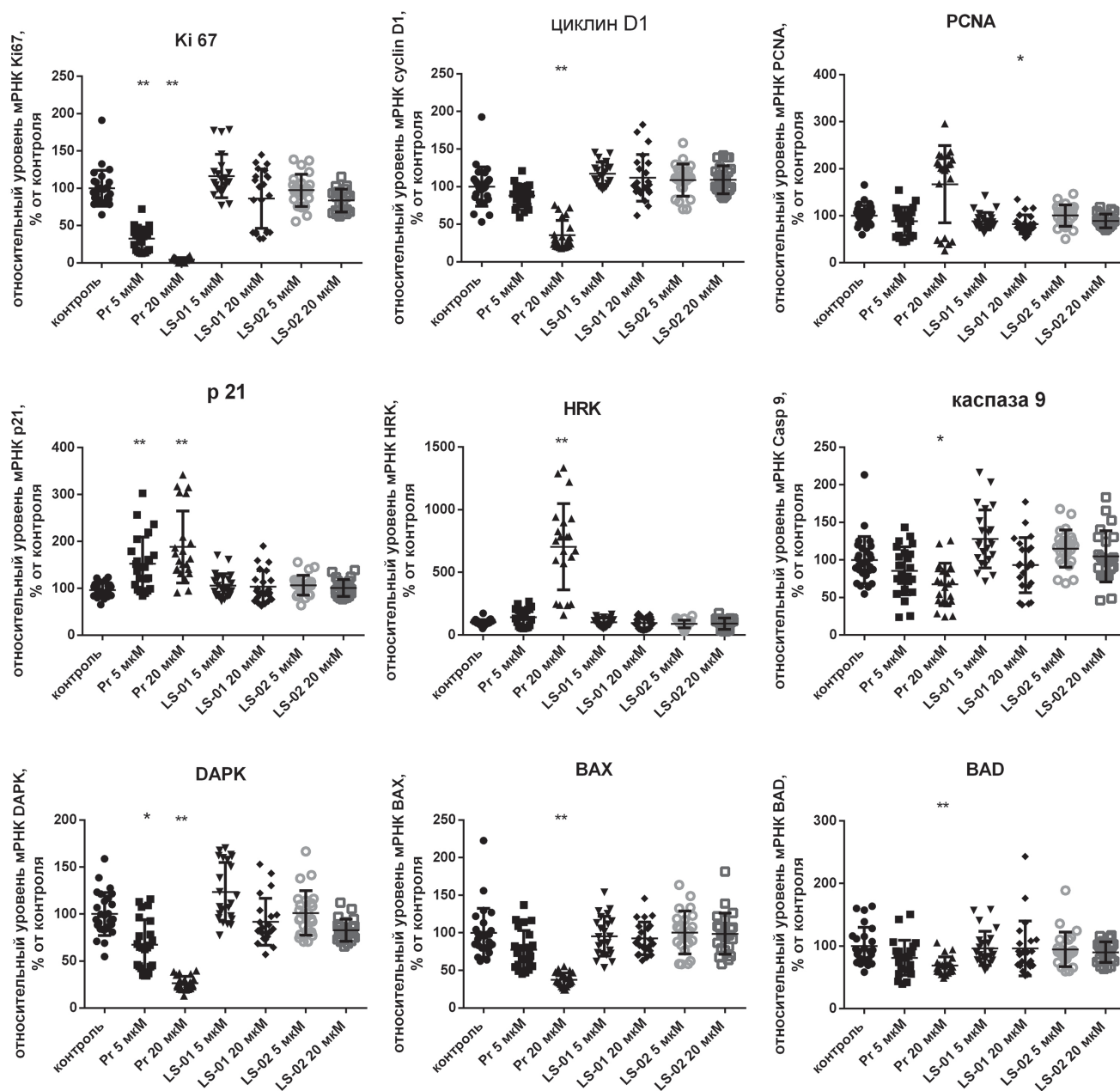


Рис. 7. Регуляция прогестероном (P4) и соединениями LS-01и LS-02 уровня экспрессии генов факторов, связанных с пролиферацией и апоптозом, в клетках HepG2. Определение содержания мРНК проводилось методом обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени, приведено значение среднего $\pm$ среднего отклонения. Отмечено достоверное отличие от контрольных значений: * $0,013 \leq p \leq 0,046$; ** $p \leq 0,0002$

прессии гена проапоптотического фактора DAPK происходит уже при 5 мкМ — на 33% ($p = 0,0013$), при 20 мкМ — на 73% ($p < 0,0001$). Селективные лиганды на экспрессию генов факторов апоптоза не оказывали достоверного действия. В работе изучалась также экспрессия гена фактора Bcl2A1. Все три исследуемых стероида не оказывали влияния на уровень мРНК этого антиапоптотического белка (данные не показаны).

Действие прогестерона и селективных лигандов mPRs на активирующее фосфорилиро-

вание p38 MAPK и JNK. На рис. 8 представлены репрезентативные данные одного из трех экспериментов по изучению активирующего фосфорилирования двух киназ под действием 20 мкМ прогестерона, LS-01 и LS-02. По результатам денситометрии соотношение фосфо-p38/p38 MAPK в контроле (рис. 8, дорожка 1) и под действием всех трех стероидов (рис. 8, дорожки 2–4) практически не менялось. Соотношение фосфо-JNK/JNK повышалось для первой изоформы в 1,9 раза под действием прогестерона (2), в 1,5 раза —

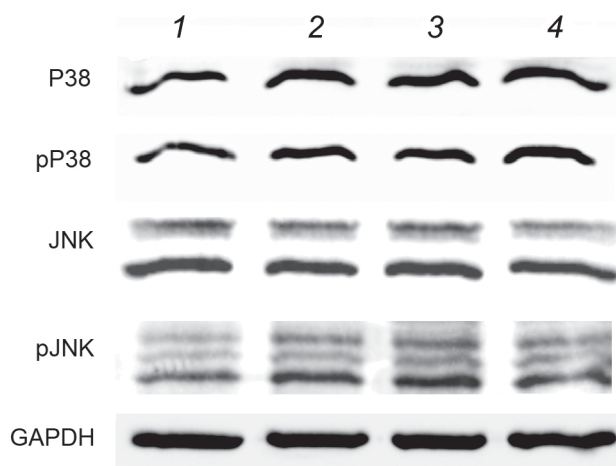


Рис. 8. Эффект прогестерона, LS-01 и LS-02 на активирующее фосфорилирование p38 MAPK и JNK в клетках HepG2. Дорожки: 1 – контроль, 2 – действие 20 мкМ прогестерона, 3 – действие 20 мкМ LS-01, 4 – действие 20 мкМ LS-02

под действием LS-01 (3) и в 1,7 раза – под действием LS-02; для второй и третьей изоформ суммарно – в 2 раза (2), в 1,7 раза (3) и в 2,2 раза (4) соответственно. Таким образом, все изучаемые соединения в клетках HepG2 активировали все изоформы JNK, но не влияли на активность p38 MAPK.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Действие прогестерона и его производных в значительной мере определяется составом рецепторов прогестерона, а также фенотипом данной конкретной клетки. В настоящей работе было изучено действие прогестерона и селективных лигандов mPRs (LS-01 и LS-02) в клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2. Это действие осуществляется преимущественно через субтип mPR β , поскольку уровень мРНК mPR β составлял 579% от мРНК референсного гена, в то время как для других мембранных рецепторов он не превышал 23%, а уровень мРНК nPR был равен нулю (рис. 1, а). Следует отметить, что такого высокого уровня экспрессии гена *PAQR8* мы не обнаружили ни в одной из 16 исследованных ранее клеточных культур, максимальными были значения 154% – в клетках LN229 и 112% – в клетках U87MG, в других линиях уровень мРНК составлял 10–50% от мРНК референсного гена [13]. Методом иммуноблоттинга также были выявлены белки этого рецептора, в то время как белки mPR α и mPR γ практически не были обнаружены (рис. 1, б).

Сродство LS-01 и LS-02 к мембранным рецепторам изучалось с использованием клеток

VxPC3 аденокарциномы поджелудочной железы человека с преимущественной экспрессией mPR α и mPR γ (270% и 283% от уровня мРНК референсного гена соответственно) и отсутствием nPRs. Оно было ниже, чем сродство прогестерона к этим рецепторам [14]. Как было показано в этой работе, в линии HepG2 содержание mPR α и mPR γ очень мало, мРНК nPRs не была обнаружена. Сродство селективных лигандов к mPR β не определялось. Важно было выяснить, могут ли наши селективные лиганды регулировать функции клеток через mPR β . Клетки HepG2 оказались наиболее подходящими для этой цели. Было обнаружено, что взаимодействие LS-01 и LS-02 с этим субтипом mPRs происходит, судя по эффектам этих соединений на активацию JNK, стимуляцию связывания клетками меченого аннексина V и на торможение некротических изменений, вызывающих проницаемость мембран. Поскольку прогестерон действует сильнее, чем селективные лиганды, можно предположить, что и к субтипу mPR β сродство прогестерона выше, чем сродство его производных. Действие изучаемых стероидов в клетках HepG2 было антипролиферативным и проапоптотическим. Изучаемые соединения подавляли жизнеспособность клеток (рис. 2), стимулировали апоптотические изменения в их мембранах (рис. 4–6). Действие всех трех стероидов приводило к активации всех изоформ JNK, при этом активирующего фосфорилирования p38 MAPK обнаружено не было (рис. 8).

Интересно было сравнить действие изучаемых стероидов в клетках HepG2 с преимущественной экспрессией mPR β с их эффектами в клетках VxPC3, где наблюдалась преимущественная экспрессия mPR α и mPR γ . В обоих типах клеток мРНК nPR не была обнаружена. В результате исследования мы показали, что эффекты изучаемых соединений разнятся в клеточных линиях HepG2 и VxPC3, но имеют общую направленность [16]. В клетках HepG2 достоверное снижение жизнеспособности наблюдалось при максимальных используемых концентрациях всех трех стероидов, тогда как жизнеспособность клеток VxPC3 подавлялась достоверно только под действием прогестерона и LS-01, а LS-02 не влиял на жизнеспособность клеток VxPC3 в ХТТ-тесте. Наличие одного субтипа mPR приводит к более универсальному действию изучаемых прогестиннов. В линии HepG2 нет такого разнообразного действия трех стероидов, которое наблюдалось в VxPC3-клетках. Там эффекты LS-02 существенно отличались от эффектов прогестерона и соединения LS-01, видимо, из-за очень

высокой экспрессии сразу двух субтипов mPRs, к которым три изучаемых стероида могут иметь разное сродство.

Значительно отличалось действие прогестерона и селективных лигандов mPRs в клеточных линиях HepG2 и VxPC3 и на фрагментацию ДНК ядер. В линии VxPC3 прогестерон и LS-01 достоверно и значительно (в 3–3,5 раза) увеличивали количество клеток с фрагментацией ДНК ядер, а LS-02 — в 2,2 раза. Главным посредником в этом действии оказалась p38 MAPK. В клетках HepG2 мы не обнаружили ни достоверного изменения этого параметра, ни активации p38 MAPK под действием изучаемых соединений.

Действие прогестерона и селективных лигандов было, наоборот, более выраженным в клетках HepG2 на ранние стадии апоптоза, выявляемые по связыванию меченого аннексина V. В клетках VxPC3 через 72 ч после инкубации с гормонами не было достоверных изменений в количестве апоптотических клеток и клеток с признаками некроза в сравнении с контролем. Наоборот, в линии HepG2 все 3 стероида, а особенно мощно прогестерон, увеличивали количество клеток с фосфатидилсерином на наружной мембране, связывающим аннексин V. Но при этом все 3 стероида, а особенно сильно прогестерон, снижали количество некротических клеток, мембраны которых проницаемы для йодида пропидия. Клетки линии HepG2 растут кластерами, не формируя монослой, в отличие от клеток линии VxPC3. При отсутствии гормонов в течение 72 ч в среде с бесстероидной сывороткой (DFBS) среди клеток HepG2 появлялась значительная популяция с признаками некротической гибели (т.е. клетки, мембраны которых проницаемы для PI). Возможно, это происходило за счет кластерного роста клеток, снижения доступности питательных веществ и/или кислорода для нижних слоев. В присутствии изучаемых стероидов рост клеток существенно замедлялся, особенно в присутствии прогестерона. Через 72 ч инкубации с гормонами клеток в лунках было значительно меньше, чем в контроле. Поэтому нижние слои страдали меньше от недостатка питательных веществ или гипоксии, некроз был выражен слабее. При этом стероиды вызывали в клетках процесс апоптотической гибели, ранние стадии которой выявлялись через 72 ч по связыванию с меченым аннексином V.

Для изучения экспрессии генов под действием прогестерона и селективных лигандов были выбраны маркеры пролиферации и факторы апоптоза, регуляцию которых мы обна-

ружили в клетках VxPC3 на уровне транскрипции. В линии HepG2 прогестерон подавлял экспрессию гена маркера пролиферации белка Ki67, циклина D1, повышал экспрессию ингибитора 1A циклин-зависимой киназы — p21. Аналогично он действовал и в клетках VxPC3. Однако эффектов LS-01 и LS-02 не было обнаружено. Возможно, активация mPR β под действием лигандов, взаимодействующих с меньшим сродством, оказалась недостаточной для проявления этого действия. Эффекты прогестерона на экспрессию генов факторов, связанных с апоптотическим процессом в клетках, оказались неожиданными. В клетках HepG2 этот гормон повышал экспрессию гена проапоптотического белка HRK (Harakiri) — белка, взаимодействующего с Bcl2, но снижал экспрессию генов других проапоптотических факторов — BAX, BAD, каспазы 9 и DAPK — протеинкиназы 1, ассоциированной со смертью (Death-associated protein kinase 1), притом что суммарный эффект на процесс апоптоза был стимулирующим. Можно предположить, что на экспрессию некоторых генов прогестерон в высоких концентрациях может действовать, активируя ядерные рецепторы глюкокортикоидов. Глюкокортикоиды действуют на гепатоциты человека и крысы, ингибируя процесс апоптоза и способствуя их выживаемости [22, 23]. Прогестерон через глюкокортикоидные рецепторы может влиять на экспрессию генов, чувствительных к этим гормонам. Селективные лиганды не взаимодействуют с ядерными рецепторами стероидных гормонов, поскольку у них отсутствует 3-кето/3-гидроксигруппа в структуре А-кольца, принципиально важная для такого взаимодействия [9, 24, 25]. Результирующее действие селективных лигандов и самого прогестерона в клетках HepG2 на жизнеспособность и апоптоз, выявляемый по появлению фосфатидилсерины на наружной мембране клеток, противоположно действию глюкокортикоидов на гепатоциты. Можно предположить, что в данном случае главное действие этих соединений направлено не на изменение транскрипции генов, а на посттранскрипционную активирующую модификацию самих белков — факторов апоптоза, которая описана в литературе [26–29]. По-видимому, это действие на посттранскрипционном уровне перекрывает побочный эффект активации прогестероном других стероидных рецепторов.

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что в клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 с высоким уровнем mPR β прогестерон и селективные лиганды, активируя сигнальный

каскад с участием JNK, действуют подавляюще на процесс пролиферации клеток, стимулируют экспонирование фосфатидилсери-на на наружной мембране клеток HepG2, что является ранней стадией апоптотических изменений. При этом замедляются процессы некротических изменений в изучаемых клетках, возможно, за счет подавления пролиферации и снижения давления на нижние слои верхних клеток в формируемых ими кластерах. На более поздние стадии апоптоза влияния LS-01, LS-02 и прогестерона выявлено не было в изученном промежутке времени. Поскольку перечисленные эффекты были вызваны не только прогестероном, но и селективными лигандами mPRs, действие это обусловлено активацией mPR β . В изучаемых HepG2-клетках все стероиды действовали однотипно, в отличие от клеток VxPC3, что также подтверждает их взаимодействие только с одним типом рецепторов. Действие прогестина на клетки HepG2, по-видимому, является специфическим именно для данного фенотипа, поскольку в первичной культуре клеток миометрия, например, действие гормона через mPR α и mPR β сопровождалось активацией p38 MAPK и приводило к фосфорилированию легких цепей миозина и сократительной активности миометрия [18].

Таким образом, мы показали, что mPR β в клетках гепатоцеллюлярной карциномы при взаимодействии с лигандами активируют сигнальный каскад, в котором принимает участие JNK, что приводит к снижению пролиферативной активности и стимуляции апоптотических процессов в этих клетках. Соедине-

ния LS-01 и LS-02 регулируют функции этих клеток, но для усиления этого действия необходимы дальнейшие поиски эффективного лиганда, обладающего сродством к данным рецепторам, сопоставимым со сродством прогестерона, но при этом не взаимодействующего с ядерными рецепторами прогестерона и других стероидов.

Вклад авторов. Щелкунова Т.А. — концепция и руководство работой; Щелкунова Т.А., Морозов И.А., Гончаров А.И. — проведение экспериментов; Левина И.С., Кузнецов Ю.В., Заварзин И.В. — химический синтез соединений LS-01 и LS-02; Щелкунова Т.А., Левина И.С., Морозов И.А., Рубцов П.М., Смирнова О.В. — обсуждение результатов исследования; Щелкунова Т.А. — написание текста; Щелкунова Т.А., Левина И.С., Морозов И.А., Рубцов П.М., Смирнова О.В. — редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-015-00092-а) и Российского научного фонда (грант № 23-25-00071, <https://rscf.ru/project/23-25-00071/>).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Щелкунова Т. А., Морозов И. А. (2015) Молекулярные основы и тканевая специфичность действия прогестина, *Мол. Биол.*, **49**, 728-748, doi: 10.7868/S0026898415050158.
2. González-Orozco, J. C., Hansberg-Pastor, V., Valadez-Cosmes, P., Nicolas-Ortega, W., Bastida-Beristain, Y., Fuente-Granada, M., González-Arenas, A., and Camacho-Arroyo, I. (2018) Activation of membrane progesterone receptor- α increases proliferation, migration, and invasion of human glioblastoma cells, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **477**, 81-89, doi: 10.1016/j.mce.2018.06.004.
3. Xiao, J., Chen, X., Lu, X., Xie, M., He, B., He, S., You, S., and Chen, Q. (2020) Progesterone/Org inhibits lung adenocarcinoma cell growth via membrane progesterone receptor α , *Thorac. Cancer*, **11**, 2209-2223, doi: 10.1111/1759_7714.13528.
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-R53, doi: 10.1530/jme-14-0252.
5. Gustafsson, J. A., (2016) Historical overview of nuclear receptors, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **157**, 3-6, doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.03.004.
6. 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 progesterone receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2237-2242, doi: 10.1073/pnas.0436133100.
7. Thomas, P., Pang, Y., Camilletti, M. A., and Castelnovo, L. F. (2022) Functions of membrane progesterone receptors (mPRs, PAQRs) in nonreproductive tissues, *Endocrinology*, **163**, bqac147, doi: 10.1210/endo/bqac147.

8. Thomas, P. (2022) Membrane progesterone receptors (mPRs, PAQRs): review of structural and signaling characteristics, *Cells*, **11**, 1785, doi: 10.3390/cells11111785.
9. Kelder, J., Pang, Y., Dong, J., Schaftenaar, G., and Thomas, P. (2022) Molecular modeling, mutational analysis and steroid specificity of the ligand binding pocket of mPR α (PAQR7): shared ligand binding with AdipoR1 and its structural basis, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **219**, 106082, doi: 10.1016/j.jsbmb.2022.106082.
10. Jyoti, M. M. S., Rana, M. R., Ali, M. H., and Tokumoto, T. (2022) Establishment of a steroid binding assay for membrane progesterone receptor alpha (PAQR7) by using graphene quantum dots (GQDs), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **592**, 1-6, doi: 10.1016/j.bbrc.2022.01.002.
11. Acharjee, M., Ali, M. H., Jyoti, M. M. S., Rezanujjaman, M., Hassan, M. M., Rana, M. R., Hossain, M. F., Kodani, S., and Tokumoto, T. (2022) The antagonistic activity of *Padina arborescens* extracts on mPR α , *Nat. Prod. Res.*, **37**, 1872-1876, doi: 10.1080/14786419.2022.2120873.
12. 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.
13. Goncharov, A. I., Maslakova, A. A., Polikarpova, A. V., Bulanov, E. A., Guseva, A. A., Morozov, I. A., Rubtsov, P. M., Smirnova, O. V., and Shchelkunova, T. A. (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., Guseva, A. A., Shchelkunova, T. A., Zavarzin, I. V., and Smirnova, O. V. (2017) Selection of progesterone derivatives specific to membrane progesterone receptors, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 140-148, doi: 10.1134/S0006297917020055.
15. Левина И. С., Щелкунова Т. А., Поликарпова А. В., Кузнецов Ю. В., Заварзин И. В. (2021) Синтез 19-гидроксипрегн-4-ен-20-она и 19-гидрокси-5 β -прегн-3-ен-20-она, селективно связывающихся с мембранными рецепторами прогестерона, и оценка их иммуномодуляторных эффектов, *Изв. АН Сер. Хим.*, **11**, 2227-2232, doi: 10.1007/s11172-021-3337-6.
16. Гончаров А. И., Левина И. С., Шляпина В. Л., Морозов И. А., Рубцов П. М., Заварзин И. В., Смирнова О. В., Щелкунова Т. А. (2021) Цитотоксические эффекты селективных лигандов мембранных рецепторов прогестерона в клетках BxPC3 аденокарциномы поджелудочной железы человека, *Биохимия*, **86**, 1702-1718, doi: 10.31857/S0320972521110087.
17. Kasubuchi, M., Watanabe, K., Hirano, K., Inoue, D., Li, X., Terasawa, K., Konishi, M., Itoh, N., and Kimura, I. (2017) Membrane progesterone receptor beta (mPR β /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. Karteris, E., Zervou, S., Pang, Y., Dong, J., Hillhouse, E. W., Randeva, H. S., and Thomas, P. (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.
19. Sinreih, M., Knific, T., Thomas, P., Grazio, S. F., and Rižner, T. L. (2018) Membrane progesterone receptors β and γ have potential as prognostic biomarkers of endometrial cancer, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, **178**, 303-311, doi: 10.1016/j.jsbmb.2018.01.011.
20. Büscher, U., Chen, F. C., Kentenich, H., and Schmiady, H. (1999) Cytokines in the follicular fluid of stimulated and nonstimulated human ovaries; is ovulation a suppressed inflammatory reaction? *Hum. Reprod.*, **14**, 162-166, doi: 10.1093/humrep/14.1.162.
21. 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.
22. Bailly-Maitre, B., Souse, G., Boulukos, K., Gugenheim, J., and Rahmani, R. (2001) Dexamethasone inhibits spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes via Bcl-2 and Bcl-xL induction, *Cell Death Differ.*, **8**, 279-288, doi: 10.1038/sj.cdd.4400815.
23. Oh, H.-Y., Namkoong, S., Lee, S.-J., Por, E., Kim, C.-K., Billiar, T. R., Han, J. A., Ha, K. S., Chung, H. T., Kwon, Y. G., Lee, H., and Kim, Y. M. (2006) Dexamethasone protects primary cultured hepatocytes from death receptor-mediated apoptosis by up-regulation of cFLIP, *Cell Death Differ.*, **13**, 512-523, doi: 10.1038/sj.cdd.4401771.
24. Williams, S. P., and Sigler, P. B. (1998) Atomic structure of progesterone complexed with its receptor, *Nature*, **393**, 392-396, doi: 10.1038/30775.
25. Tanenbaum, D. M., Wang, Y., Williams, S. P., and Sigler, P. B. (1998) Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5998-6003, doi: 10.1073/pnas.95.11.5998.
26. Moldoveanu, T., and Czabotar, P. E. (2020) BAX, BAK, and BOK: a coming of age for the BCL-2 family effector proteins, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **12**, a036319, doi: 10.1101/cshperspect.a036319.

27. Kale, J., Osterlund, E. J., and Andrews, D. W. (2018) BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death, *Cell Death Differ.*, **25**, 65-80, doi: 10.1038/cdd.2017.186.
28. Morley, S. J., Coldwell, M. J., and Clemens, M. J. (2005) Initiation factor modifications in the preapoptotic phase, *Cell Death Differ.*, **12**, 571-584, doi: 10.1038/sj.cdd.4401591.
29. Roberts, J. Z., Crawford, N., and Longley, D. B. (2022) The role of ubiquitination in apoptosis and necroptosis, *Cell Death Differ.*, **29**, 272-284, doi: 10.1038/s41418-021-00922-9.

EFFECTS OF PROGESTERONE AND SELECTIVE LIGANDS OF MEMBRANE PROGESTERONE RECEPTORS IN HepG2 CELLS OF HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

T. A. Shchelkunova^{1*}, I. S. Levina², I. A. Morozov³, P. M. Rubtsov³, A. I. Goncharov¹,
Yu. V. Kuznetsov², I. V. Zavarzin², and O. V. Smirnova¹

¹ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia; e-mail: Shchelkunova-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 exerts multiple effects in different tissues through nuclear receptors (nPRs) and through membrane receptors of the adiponectin and progestin receptor (mPRs) family. The effect of progesterone on cells through different types of receptors can vary significantly. At the same time, it affects the processes of proliferation and apoptosis in normal and tumor tissues in a dual way, stimulating proliferation and carcinogenesis in some tissues, suppressing them and stimulating cell death in others. In this study, we have shown the presence of a high level of mRNA and mPR β protein in HepG2 tumor cells of human hepatocellular carcinoma. Expression of other membrane and classical nuclear receptors was not detected. May be mPR β has an important function in HepG2 cells. The main goal of the work was to study the function of this protein and the mechanisms of its action in human hepatocellular carcinoma cells. Previously, we have identified selective mPRs ligands, compounds LS-01 and LS-02, which do not interact with nuclear receptors. Their employment allows differentiating the effects of progestins mediated by different types of receptors. The work studied the effects of progesterone, LS-01 and LS-02 on the proliferation and death of HepG2 cells, as well as the activating phosphorylation of two kinases, p38 MAPK and JNK, under the action of three steroids. It was shown that all three progestins after 72 hours of incubation with cells suppressed their viability and stimulated the appearance of phosphatidylserine on the outer surface of membranes, which was detected by binding to V-FITC annexin, but they did not affect DNA fragmentation of cell nuclei. Progesterone significantly reduced the expression of proliferation marker genes and stimulated the expression of the p21 protein gene, but had a suppressive effect on the expression of some proapoptotic factor genes. All three steroids activated JNK in these cells, but had no effect on p38 MAPK activity. The effects of progesterone and selective mPRs ligands in HepG2 cells were the same in terms of suppression of proliferation and stimulation of apoptotic changes in outer membranes, therefore, they were mediated through interaction with mPR β . JNK is a member of the signaling cascade activated in these cells by the studied steroids.

Keywords: progesterone, selective ligands of membrane progesterone receptors, proliferation, apoptosis, nuclear progesterone receptor, membrane progesterone receptor β , human HepG2 hepatocellular carcinoma cells