

УДК 577.218

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ BRCA1 И ЭСТРОГЕНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ α В КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ© 2019 г. А. М. Щербаков^а, Е. А. Шестакова^{а, *}, К. Е. Галеева^а, Т. А. Богуш^а^аНациональный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 115478 Россия

*e-mail: elenaanshestakova@mail.ru

Поступила в редакцию 09.11.2018 г.

После доработки 17.01.2019 г.

Принята в печать 23.01.2019 г.

Белок BRCA1 (breast cancer 1) участвует в поддержании стабильности генома, выполняя свою основную функцию репарации ДНК, главным образом, путем гомологичной рекомбинации. Нарушение этой функции BRCA1 ассоциировано с развитием рака молочной железы (PMЖ), рака яичников. Несмотря на важную роль BRCA1 в репарации поврежденных ДНК во всех типах клеток, развитие BRCA1-ассоциированного рака наблюдается, в основном, в эстрогензависимых тканях организма, таких как ткань молочной железы и яичников. В экспериментах *in vitro* с использованием клеток PMЖ линии MCF-7 продемонстрировано ингибирующее действие эстрогена 17 β -эстрадиола (E2), фитоэстрогенов (генистеина и апигенина) и антиэстрогенов (тамоксифена и фулвестранта) на экспрессию эстрогеновых рецепторов α (ЭР α); при этом только генистеин оказывал влияние на BRCA1, усиливая его экспрессию. В условиях гипоксии, одного из факторов прогрессии солидных опухолей, в клетках MCF-7 отмечено уменьшение экспрессии BRCA1 и ЭР α . Следовательно, гипоксия влияет на BRCA1-ассоциированные процессы репарации ДНК и одновременно воздействует на гормональную регуляцию роста клеток PMЖ. Таким образом, продемонстрирована взаимосвязь BRCA1 и сигнальных путей стероидных гормонов в клетках PMЖ и обсуждается целесообразность комплексного изучения механизмов регуляции экспрессии BRCA1 и эстрогеновых рецепторов, включая эпигенетическую регуляцию экспрессии генов.

Ключевые слова: белок BRCA1, эстрогеновые рецепторы, рак молочной железы, клетки MCF-7, проточная цитофлуориметрия, гипоксия, фитоэстрогены, эстрогены

DOI: 10.1134/S0026898419030169

ВВЕДЕНИЕ

Продукт гена *BRCA1* (breast cancer 1), белок BRCA1, участвует в поддержании стабильности генома, выполняя свою основную функцию репарации ДНК путем гомологичной рекомбинации [1–3] и негомологичного соединения концов ДНК [4]. Это белок с молекулярной массой 220 кДа, экспрессия которого регулируется эпигенетическими механизмами [1, 5, 6].

Нарушение функционирования BRCA1 приводит к развитию ряда онкологических заболеваний, в основном, рака молочной железы (PMЖ) и рака яичников. Несмотря на большую роль мутаций в гене *BRCA1* в развитии наследственных форм BRCA1-ассоциированных онкологических заболеваний [7, 8], спорадические формы BRCA1-ассоциированного рака, кроме небольшого числа слу-

чаев, вызванных соматическими мутациями [9], определяются эпигенетической регуляцией экспрессии *BRCA1* [5].

Эпигенетические механизмы регуляции экспрессии *BRCA1* детально освещены в обзорах [5, 6]. К настоящему времени известно несколько основных молекулярных механизмов нарушения функции BRCA1: 1) эпигенетическое ингибирование синтеза мРНК и белка BRCA1, происходящее в результате метилирования CpG-островков в промоторе гена *BRCA1* [10, 11], 2) изменение экспрессии BRCA1 за счет ковалентных модификаций гистонов в гене *BRCA1* [12, 13] и 3) регуляция факторами транскрипции [14]. Также следует упомянуть потерю гетерозиготности, приводящую к полному отсутствию как мРНК, так и белка BRCA1 [15], амплификацию гена *BRCA1* [16] и aberrантное увеличение уровня экспрессии *BRCA1* [3].

Сокращения: АТ – антитела; ИФ-ПЦФ – иммунофлуоресцентный метод, ассоциированный с проточной цитофлуориметрией; PMЖ – рак молочной железы; ЭР α – эстрогеновый рецептор α ; *BRCA1* (breast cancer 1) – ген-супрессор опухолей; BRCA1 (breast cancer 1) – белок-супрессор опухолей; TPZ (tirapazamine) – тирапазамин.

Уменьшение уровня белка BRCA1 при гипоксии, эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП) сопровождается модификациями гистонов в промоторе гена *BRCA1* [12, 13]. Уменьшение экспрессии *BRCA1* при гипоксии обусловлено рядом модификаций в гистоне H3: деметилированием Lys в позиции 4 (H3K4me), деацетилированием H3K9ac, сопряженным с метилированием H3K9 [12]. При ЭМП снижение экспрессии *BRCA1* связано с деметилированием H3K4me2 [13].

Несмотря на ключевую роль BRCA1 в репарации повреждений ДНК во всех типах клеток, развитие BRCA1-ассоциированного рака наблюдается в основном в эстрогензависимых тканях организма, таких как ткань молочной железы и яичников. Описанная в литературе взаиморегуляция экспрессии BRCA1 и эстрогенового рецептора α (ЭР α), как на уровне транскрипции, так и на уровне посттрансляционных модификаций белков, проливает свет на возможные причины тканеспецифичности развития BRCA1-ассоциированных онкологических заболеваний. С одной стороны, ген, кодирующий ЭР α , *ESR1*, служит мишенью коактиватора транскрипции – BRCA1 (рис. 1а). В связи с этим количество транскриптов ЭР α , синтезируемых с гена *ESR1*, прямо пропорционально количеству немутированного, функционального белка BRCA1. BRCA1 в комплексе с фактором транскрипции Oct-1 активируют транскрипцию гена *ESR1* в линиях клеток РМЖ: MCF-7 и T47D (рис. 1а) [17]. С другой стороны, ген *BRCA1*, будучи мишенью ЭР α , регулируется ЭР α в ассоциации с фактором транскрипции AP1 (c-Jun/c-Fos) и коактиваторами – ацетилтрансферазами гистонов (CBP/p300) (рис. 1б) [18–20]. В результате в опухолях молочной железы с уменьшенным содержанием белка BRCA1, как правило, снижено содержание белка ЭР α [17]. Таким образом, нарушение функционирования белка BRCA1 в результате эпигенетического ингибирования гена *BRCA1* приводит к обращению статуса ЭР α в опухоли с положительного на отрицательный и к развитию BRCA1-зависимых ЭР α -негативных опухолей, не поддающихся лечению таргетной, антиэстрогеновой, терапией.

Помимо регуляции на уровне генов BRCA1 ингибирует активность ЭР α за счет белок-белковых взаимодействий – в результате BRCA1-зависимого убиквитинирования рецептора и ингибирования его ацетилирования [21], что приводит к нарушению регуляции генов, зависимых от ЭР α . Одна из мишеней ЭР α – ген прогестеронового рецептора (ПР), нарушение уровня экспрессии которого приводит к развитию некоторых подтипов РМЖ [22–24]. Более того, ген *ESR1* – мишень своего продукта, ЭР α , а также ЭР β [25]. Следует отметить, что Oct-1 и ЭР β , регулирующие ген *ESR1*, имеют похожую структуру, так как узнаются моноклональным антителом 14C8, широко исполь-

зуемым для детектирования ЭР β в ткани опухоли и в культурах клеток [26].

Среди лигандов, связывающихся и влияющих на активность ЭР α , выделяют эстрогены, в большинстве случаев активирующие ЭР α , такие как 17 β -эстрадиол (Е2) и фитоэстроген генистеин, и антиэстрогены, ингибирующие ЭР α , такие как тамоксифен и фулвестрант.

В ряде последних исследований продемонстрирована прогностическая и предиктивная значимость BRCA1, а также другого белка репарации ДНК – ERCC1 [5, 6, 27]. При анализе уровня экспрессии BRCA1 в ЭР-негативных и ЭР-позитивных опухолях Богуш и др. [28] выявили, что пониженный уровень экспрессии BRCA1 может быть прогностическим маркером неблагоприятного течения РМЖ. В этом исследовании для точной количественной оценки уровня экспрессии белка BRCA1 в ткани РМЖ нами был применен метод иммунофлуоресцентного анализа, ассоциированного с проточной цитофлуориметрией (ИФ-ПЦФ). Этот метод был усовершенствован и широко применялся в нашей лаборатории для количественной оценки уровня экспрессии белковых онкомаркеров, включая рецепторы эстрогенов, маркер репарации ДНК, ERCC1, маркеры множественной лекарственной резистентности [29–31].

Теперь нами исследовано влияние (фито)эстрогенов и антиэстрогенов на экспрессию BRCA1 и ЭР α в клетках РМЖ линии MCF-7 и определена экспрессия этих белков в условиях гипоксии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клетки. Клетки MCF-7, полученные из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, США), до проведения экспериментов хранили в криобанке Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Идентичность и стабильность линий подтверждали с помощью анализа коротких tandemных повторов (“GORDIZ”, Россия). Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят (“HyClone”, США), 50 ед./мл гентамицина (“ПанЭко”, Россия) и 0.1 мг/мл пирувата натрия (“Santa Cruz”, США) при 37°C, 5% CO₂ и относительной влажности 80–85%. Во всех экспериментах использовали клетки в логарифмической фазе роста.

Анализ экспрессии ЭР α и BRCA1 в клетках MCF-7. В экспериментах по влиянию эстрогенов и антиэстрогенов на экспрессию ЭР α и BRCA1 клетки РМЖ линии MCF-7 культивировали в среде DMEM без фенолового красного с добавлением сыворотки телят без стероидов (SH30068/03, “HyClone”, США). Инкубацию клеток с эстрогенами и антиэстрогенами проводили в течение 24 ч. В экс-

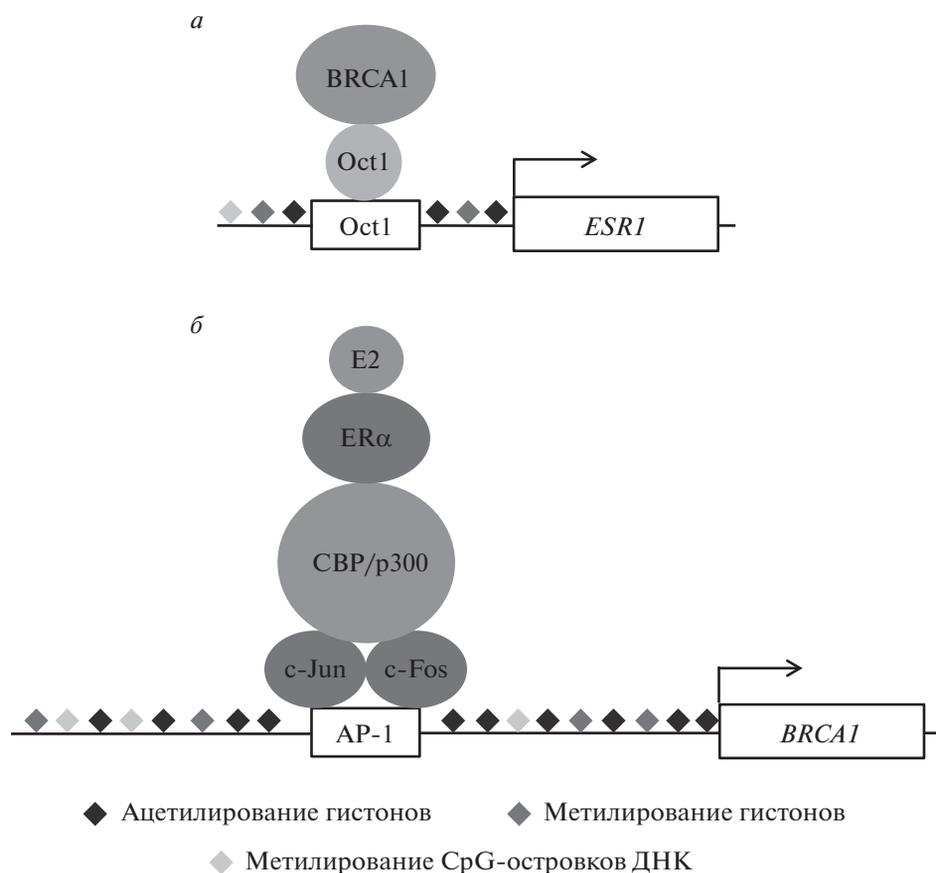


Рис. 1. Взаиморегуляция экспрессии BRCA1 и ЭР α . *а* – Ген *ESRI*, кодирующий ЭР α , – мишень коактиватора транскрипции BRCA1. BRCA1 и фактор транскрипции Oct-1 активируют транскрипцию гена *ESRI*. *б* – Ген *BRCA1* – мишень ЭР α и регулируется активированным эстрогеном ЭР α совместно с фактором транскрипции AP-1 (c-Jun/c-Fos) и коактиватором транскрипции – ацетилтрансферазой гистонов CBP/p300.

периментах использовали 10-нМ 17 β -эстрадиол (E2; Cat. # E2758; “Sigma-Aldrich”), 5-мкМ тамоксифен (Cat. # 13258; “Cayman Chemical”, США), 0.1-мкМ фулвестрант, генистеин (концентрация 0.5, 10, 15, 20 и 30 мкМ) и апигенин (концентрация 15 мкМ и 30 мкМ). Суспензии клеток инкубировали с первичными мышинными моноклональными антителами (АТ) к BRCA1 (0.006 мкг/мл; Cat.# SD118, “Calbiochem”) или первичными мышинными моноклональными АТ к ЭР α (0.008 мкг/мл или 0.032 мкг/мл; Cat. # ab27614, клон SP-1, “Abscam”) в течение 15–20 ч и с соответствующими вторичными флуоресцентными АТ (DyLight650, Cat. # ab98729 и Cat. # ab98510; “Abscam”) в течение 1.5 ч. Флуоресценцию клеток измеряли с помощью проточного цитофлуориметра Navios (“Beckman Coulter”, США).

В экспериментах по влиянию гипоксии на экспрессию маркеров клетки инкубировали в среде DMEM, содержащей 10% сыворотки телят, в течение 24, 96, 144 или 240 ч в атмосфере, содержащей 1% O₂.

В экспериментах по влиянию на экспрессию маркеров тирапазамина (TPZ) – соединения, активируемого в условиях гипоксии и вызывающего двухцепочечные разрывы в молекуле ДНК, – клетки инкубировали в условиях гипоксии в течение 72 ч, а затем в присутствии 5 или 10 мкМ TPZ в условиях гипоксии в течение 24 ч. В качестве контроля использовали клетки, которые инкубировали в нормальных условиях с теми же концентрациями TPZ и в течение того же времени. Уровни экспрессии маркеров в клетках определяли методом ИФ-ПЦФ, как указано выше.

Обработка результатов. Показатели экспрессии BRCA1 и ЭР α получены с помощью программы FlowJo 10.0 (<https://www.flowjo.com>) с использованием статистического метода Колмогорова-Смирнова [32]. Экспрессию маркеров оценивали по следующим показателям: 1) уровень (L, level) определяли как процентное содержание специфически флуоресцирующих клеток относительно показателя в контроле (инкубация со вторичными антителами); 2) интенсивность (I, intensity) – как отношение специфической флуоресценции

Таблица 1. Влияние эстрогенов и антиэстрогенов на экспрессию BRCA1 и ЭР α в клетках РМЖ линии MCF-7

Соединение, концентрация	Изменение показателя экспрессии маркера*					
	BRCA1			ЭР α		
	L	I	Pr	L	I	Pr
Генистеин, мкМ						
0.5	1.2 \uparrow	1.4 \uparrow	1.7 \uparrow	1.2 \downarrow	2.4 \downarrow	2.9 \downarrow
10.0	1.1 \uparrow	1.2 \uparrow	1.3 \uparrow	1.3 \downarrow	3.0 \downarrow	3.9 \downarrow
20.0	1.0	1.0	1.0	1.3 \downarrow	3.1 \downarrow	4.0 \downarrow
Апигенин, мкМ						
15.0	1.1 \downarrow	1.1 \downarrow	1.2 \downarrow	1.6 \downarrow	2.9 \downarrow	4.6 \downarrow
Тамоксифен, мкМ						
5.0	1.0	1.1 \uparrow	1.1 \uparrow	1.0	1.2 \downarrow	1.2 \downarrow
17 β -Эстрадиол, нМ						
10.0	1.0	1.1 \uparrow	1.1 \uparrow	1.1 \downarrow	3.7 \downarrow	4.1 \downarrow
Фулвестрант, мкМ						
0.1	1.1 \downarrow	1.0	1.1 \downarrow	1.2 \downarrow	4.5 \downarrow	5.4 \downarrow

* Клетки инкубировали со всеми соединениями в течение 24 ч. Обозначения здесь и во всех таблицах: L – уровень, I – интенсивность, Pr – индекс; \downarrow – уменьшение показателей экспрессии по сравнению с контролем, \uparrow – увеличение. Представлены типичные результаты трех экспериментов.

клеток в опытном образце к контролю; 3) индекс (Pr, product) – как произведение уровня и интенсивности экспрессии маркера, деленное на 100.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние фитоэстрогенов на экспрессию BRCA1 и ЭР α

Изучение влияния фитоэстрогенов (генистеина и апигенина) на экспрессию BRCA1 и ЭР α проведено в культуре клеток линии MCF-7 гормонозависимого РМЖ. Экспрессию белка BRCA1 анализировали в условиях, при которых происходят изменения в экспрессии генов и эпигенетические модификации хроматина (гистоновых белков и ДНК). К таким условиям относится индуцируемая фитоэстрогенами активация гена BRCA1 [33–35].

Продемонстрировано зависимое от дозы фитоэстрогена генистеина изменение экспрессии BRCA1 и ЭР α . При воздействии генистеина в низкой концентрации (0.5 мкМ) наблюдалось увеличение индекса экспрессии BRCA1 в 1.7 раза (табл. 1). При более высокой концентрации генистеина (10 мкМ) индекс экспрессии BRCA1 повышался в 1.3 раза, а увеличение концентрации генистеина до 20 мкМ не изменяло исходный индекс экспрессии BRCA1.

В отношении экспрессии ЭР α (табл. 1) эффект генистеина был противоположным. В ряду концентраций фитоэстрогена 0.5 \rightarrow 10 \rightarrow 20 мкМ отмечено уменьшение индекса экспрессии ЭР α в 2.9, 3.9 и 4.0 раза соответственно, то есть влияние генистеина было максимальным при концентрации 20 мкМ. Таким образом, результат воздействия генистеина на экспрессию ЭР α противоположен по направленности и более выражен, чем на BRCA1.

Важно заметить и качественные различия воздействия генистеина на индекс экспрессии BRCA1 и ЭР α . Как упоминалось выше, это интегральный показатель экспрессии маркеров, который включает процентное содержание клеток, экспрессирующих маркер, и его количество в каждой клетке. К снижению индекса экспрессии ЭР α привело изменение интенсивности и в меньшей степени уровня маркера. При исследовании BRCA1 выявлено воздействие фитоэстрогена на оба показателя. Иными словами, генистеин индуцировал повышенную экспрессию белка не только в BRCA1-позитивных клетках, но и в исходно BRCA1-негативных. Это наблюдение согласуется с ранее опубликованными результатами, полученными методом иммуноблоттинга, по активации экспрессии BRCA1 под влиянием генистеина в низких концентрациях [33]. Как видно из данных, представленных табл. 1, апигенин (фитоэстроген из класса флавонов) не вызывал изменений в экс-

прессии BRCA1, но значимо снижал экспрессию ЭР α . Инкубация клеток с апигенином в концентрации 15 мкМ приводила к уменьшению индекса экспрессии ЭР α в 4.6 раза; при увеличении концентрации апигенина до 30 мкМ изменений индекса экспрессии ЭР α не было.

На основании полученных результатов можно предполагать, что механизмы воздействия двух фитоэстрогенов на экспрессию BRCA1 различны, так как генистеин усиливал экспрессию BRCA1, а апигенин не влиял на нее. При воздействии как генистеина, так и апигенина отмечено значительное снижение экспрессии ЭР α .

На основании как литературных данных последних лет, так и результатов наших исследований, можно сделать вывод, что фитоэстрогены проявляют высокую цитотоксическую активность в отношении клеток РМЖ [36–38]. Так, фитоэстроген генистеин оказывает цитотоксическое действие на клетки РМЖ различных молекулярных подтипов и рассматривается как перспективный цитостатический и проапоптотический агент [36, 37]. В настоящее время активно обсуждается применение генистеина в комплексной терапии рака [39]. В исследовательских центрах по всему миру проходят клинические испытания этого фитоэстрогена в качестве перспективного противоопухолевого препарата, а также как средства для поддерживающей терапии (номера исследований в базе www.clinicaltrials.gov: NCT01126879, NCT02336087, NCT00078923, NCT00276835).

Теперь нами выявлено, что воздействие генистеина на клетки гормонозависимого РМЖ отчасти реализуется через усиление экспрессии опухолевого супрессора BRCA1.

Влияние эстрогенов и антиэстрогенов на экспрессию BRCA1 и ЭР α

Изучение влияния эстрогена 17 β -эстрадиола (E2), а также антиэстрогенов, тамоксифена и фулвестранта, на экспрессию BRCA1 и ЭР α проведено на той же культуре клеток MCF-7 гормонозависимого РМЖ. Экспрессию BRCA1 анализировали в условиях, сопровождающихся активацией или ингибированием ЭР α .

Как представлено в табл. 1, антиэстроген тамоксифен незначительно влиял на показатели экспрессии ЭР α и BRCA1. При инкубации клеток с E2 или с фулвестрантом — необратимым ингибитором ЭР α , вызывающим деградацию рецептора, — не выявлено существенных изменений уровня, интенсивности и индекса экспрессии BRCA1 по сравнению с контролем (табл. 1, рис. 2).

Напротив, показатели экспрессии ЭР α в этих условиях значительно снизились. При инкубации с E2 интенсивность и индекс экспрессии ЭР α снизились соответственно в 3.7 и 4.1 раза, а под

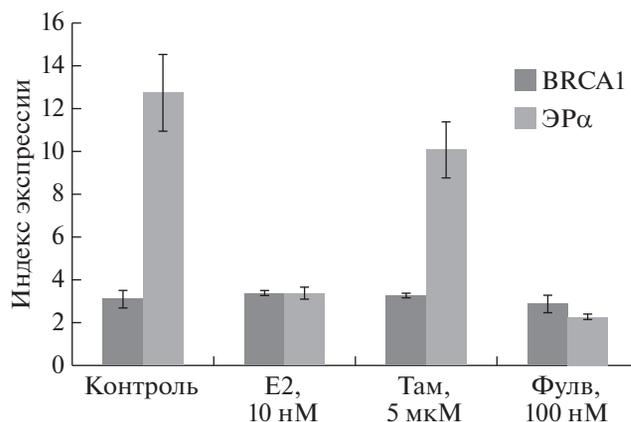


Рис. 2. Воздействие эстрогена 17 β -эстрадиола (E2), антиэстрогенов тамоксифена (Там) и фулвестранта (Фульв) на экспрессию BRCA1 и ЭР α в клетках MCF-7. E2, тамоксифен и фулвестрант не влияли на экспрессию BRCA1, в то время как E2 и фулвестрант значительно снижали экспрессию ЭР α .

действием фулвестранта — в 4.5 и 5.4 раз. Необходимо отметить, что в обоих случаях снижение индекса экспрессии ЭР α происходило в результате уменьшения интенсивности экспрессии ЭР α ; при этом уровень экспрессии маркера уменьшался незначительно (табл. 1). Иными словами, инкубация с эстрогеном или необратимым ингибитором ЭР α не изменяет количества клеток, экспрессирующих ЭР α , но приводит к выраженному уменьшению внутриклеточного содержания маркера.

Таким образом, E2 и антиэстрогены, фулвестрант и тамоксифен, не оказывали влияния на уровень экспрессии BRCA1, определенный методом ИФ-ПЦФ, в клетках линии MCF-7. Что касается ЭР α , то E2 и фулвестрант значительно снижали его экспрессию, в то время как тамоксифен, вызывающий стабилизацию неактивного ЭР α в цитоплазме, почти не влиял на показатели экспрессии этого маркера.

Влияние гипоксии на экспрессию BRCA1 и ЭР α

Прогрессия солидных новообразований сопровождается, как правило, постепенным снижением оксигенации опухолевой ткани, или гипоксией. Согласно данным литературы, рост солидных опухолей в условиях гипоксии характеризуется изменениями метаболизма клеток, а также их пониженной чувствительностью к радио- и химиотерапии [40–43]. При исследовании влияния гипоксии на экспрессию BRCA1 и ЭР α нами выявлено, что при переводе клеток MCF-7 в условия гипоксии (1% O $_2$), то есть при понижении концентрации кислорода с 21 до 1%, снижение показателей экспрессии BRCA1 зависело от времени инкуба-

Таблица 2. Экспрессия BRCA1 и ЭР α в клетках MCF-7 в условиях гипоксии

Время*, ч	Изменение показателей экспрессии (относительно контроля)					
	BRCA1			ЭР α		
	L	I	Pr	L	I	Pr
24	1.3↓	1.2↓	1.6↓	1.1↓	1.3↓	1.4↓
96	1.4↓	1.2↓	1.7↓	1.0	1.0	1.0
144	1.5↓	1.2↓	1.8↓	1.1↓	1.2↓	1.3↓
240	1.9↓	1.1↓	2.1↓	1.5↓	2.1↓	3.2↓

* Время инкубации клеток в условиях гипоксии (1% O₂).

ции (табл. 2). Так, по сравнению с контрольными клетками MCF-7 (нормоксия) в помещенных в условия гипоксии клетках уже через 24 ч уровень экспрессии снижался в 1.3 раза, а индекс в 1.6 раза. С увеличением времени инкубации происходило уменьшение этих показателей: через 96 ч индекс экспрессии BRCA1 снижался в 1.7 раз, через 144 ч – в 1.8 раз и через 240 ч – в 2.1 раза.

В условиях гипоксии также наблюдалось уменьшение интенсивности и индекса экспрессии ЭР α по сравнению с контрольными клетками. Так, при инкубации клеток в течение 240 ч этот интегральный показатель снижался в 3.2 раза (табл. 2). Обобщая сказанное, следует отметить, что уменьшение индекса экспрессии BRCA1 в условиях гипоксии, в основном, было вызвано снижением уровня маркера (то есть, количества клеток, экспрессирующих маркер), а не интенсивности экспрессии, которая оставалась приблизительно одинаковой при увеличении длительности гипоксических условий (табл. 2). В случае ЭР α уменьшение индекса экспрессии в условиях гипоксии было связано с понижением как уровня маркера, так и интенсивности экспрессии (табл. 2). Такое влияние гипоксии на экспрессию BRCA1 принципиально отличается от эффекта фитоэстрогена генистеина на экспрессию этого маркера: в условиях гипоксии выявлена тенденция к уменьшению экспрессии BRCA1, в основном, за счет снижения уровня экспрессии BRCA1, а при воздействии фитоэстрогена генистеина наблюдалось увеличение экспрессии BRCA1, в основном, за счет повышения интенсивности экспрессии. Другими словами, в условиях гипоксии снижение экспрессии BRCA1 вызвано, в значительной мере, уменьшением количества клеток, экспрессирующих маркер, а при воздействии фитоэстрогена генистеина повышение экспрессии BRCA1, в основном, обусловлено увеличением количества маркера в уже экспрессирующих его клетках.

TPZ – цитотоксин, селективно активируемый ферментами в клетках при снижении уровня кислорода (гипоксии). TPZ вызывает двухцепочечные разрывы в молекуле ДНК и последующий

апоптоз в условиях гипоксии. Это соединение считается кандидатом в лекарственные средства для терапии ряда солидных новообразований [44]. Инкубация клеток с TPZ в условиях нормоксии не вызывала существенных изменений индекса экспрессии BRCA1 (табл. 3). Однако TPZ в концентрации 5 мкМ влиял на экспрессию ЭР α в условиях нормоксии – индекс возрос в 1.4 раза. Инкубация клеток с 5 мкМ TPZ в гипоксических условиях не приводила к существенным изменениям в индексе экспрессии ЭР α и BRCA1. Увеличение концентрации TPZ до 10 мкМ приводило к повышению индекса экспрессии BRCA1 в 1.5 раза с одновременным снижением индекса экспрессии ЭР α в 4.1 раза (табл. 3). Возрастание индекса экспрессии BRCA1 в основном обусловлено увеличением уровня экспрессии BRCA1, а не интенсивности экспрессии маркера. Это значит, что повышение экспрессии BRCA1 под действием TPZ обусловлено, в основном, увеличением числа новых клеток, экспрессирующих BRCA1. Таким образом, появление двухцепочечных разрывов в ДНК в условиях гипоксии приводит не только к транслокации BRCA1 в места повреждений ДНК [3], но и к увеличению количества клеток, экспрессирующих этот белок репарации ДНК.

В случае ЭР α уменьшение индекса экспрессии, в основном, обусловлено снижением уровня и, в меньшей степени, интенсивности экспрессии. Следовательно, при инкубации с TPZ уменьшение экспрессии ЭР α происходит, главным образом, за счет уменьшения числа клеток, его экспрессирующих (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В проведенных экспериментах *in vitro* выявлены некоторые особенности регуляции экспрессии белков BRCA1 и ЭР α в клетках РМЖ линии MCF-7. Обнаружено, что два исследованных фитоэстрогена, генистеин и апигенин, по-разному влияли на экспрессию BRCA1 и ЭР α : первый вызывал усиление экспрессии BRCA1 и снижение ЭР α , в то время как второй снижал экспрессию ЭР α , но не влиял на BRCA1.

Таблица 3. Экспрессия BRCA1 и ЭР α в клетках MCF-7 при воздействии TPZ

Условия	[TPZ], мкМ	Изменение показателя экспрессии (относительно контроля)*					
		BRCA1			ЭР α		
		L	I	Pr	L	I	Pr
Нормоксия	5	1.2↓	1.1↓	1.3↓	1.3↑	1.1↑	1.4↑
	10	1.1↓	1.1↓	1.2↓	1.2↑	1.0	1.2↑
Гипоксия	5	1.2↑	1.0	1.2↑	1.1↓	1.1↓	1.2↓
	10	1.4↑	1.1↑	1.5↑	2.7↓	1.5↓	4.1↓

* Клетки инкубировали в условиях нормоксии или гипоксии в течение 72 ч, затем добавляли TPZ в соответствующей концентрации и инкубировали еще в течение 24 ч (к контрольным клеткам TPZ не добавляли).

Эстроген 17 β -эстрадиол (E2) и антиэстроген фулвестрант снижали экспрессию ЭР α , но не влияли на BRCA1. Согласно литературным данным [45, 46], E2 индуцирует снижение уровня ЭР α , одновременно усиливая экспрессию белков, гены которых служат мишенями ЭР α : прогестеронового рецептора, pS2, GREB1 и SDF1. При рассмотрении механизма действия E2 следует отметить, что ЭР α , как и многие другие факторы транскрипции, подвергается ассоциированному с транскрипцией генов-мишеней протеолизу [47]. Известно, что E2 вызывает Src-зависимое фосфорилирование ЭР α по Tyr537, это приводит к ассоциации ЭР α с коактиватором E6-AP, активации генов-мишеней ЭР α , убиквитинированию ЭР α на промоторах генов *pS2* и *GREB1* в результате действия E6-AP с убиквитинлигазной активностью и последующей протеасомной деградации ЭР α [47]. Ранее показано, что E2 активирует убиквитинирование ЭР α и его протеасомную деградацию [48], а протеасомные ингибиторы индуцируют повышение уровня ЭР α , но при этом нарушают транскрипцию ряда его генов-мишеней [49]. Кроме того, деубиквитинаяза OTUB1 деубиквитинирует ЭР α и понижает его транскрипционную активность [50]. Таким образом, убиквитинирование ЭР α необходимо для эффективной транскрипции генов-мишеней и в тоже время приводит к его последующей деградации. В связи с этим неудивительно, что в эстроген-негативных опухолях регистрируют высокие уровни мРНК ЭР α , но не транслируемого белка [51]. По-видимому, причина этого кроется в сопряженном с транскрипцией генов-мишеней убиквитинировании ЭР α и его последующей протеасомной деградации [47].

Следует также отметить, что лиганды, влияющие на экспрессию генов с участием эпигенетических механизмов, включая модификации гистонов, не всегда приводят к пропорциональному изменению синтеза соответствующих мРНК и белков. Такое несоответствие уровней мРНК и белка может быть

связано с регуляцией на уровне трансляции мРНК под влияние различных факторов, например, при нарушении клеточного метаболизма, в процессе развития или клеточной трансформации [52, 53]. Регуляцией экспрессии гена *BRCA1* на уровне трансляции кодируемой им мРНК, по-видимому, можно объяснить зарегистрированные нами изменения в синтезе белка BRCA1 (приблизительно в 2 раза) при воздействии фитоэстрогенов и под влиянием гипоксии. По литературным данным, в некоторых случаях синтез мРНК увеличивается значительно сильнее, чем синтез белка, например, при воздействии E2 на синтез мРНК и белка BRCA1 в клетках РМЖ линии MCF-7 [54]. Иногда эффект того или иного соединения можно зарегистрировать только на уровне мРНК и не обнаружить на уровне белка – как при воздействии фитоэстрогена ресвератрола на экспрессию того же гена *BRCA1* [55]. По-видимому, в этих случаях действуют молекулярные механизмы, ингибирующие синтез белка на той или иной стадии трансляции (РНК-интерференция, ингибирование инициации и элонгации трансляции) и/или приводящие к его посттрансляционной модификации и деградации. Такая система представляет большой интерес в плане исследования непосредственного эффекта модификаций гистонов на изменение синтеза мРНК *BRCA1*, вне зависимости от количества конечного продукта – белка BRCA1.

Dagdemiğ и др. [34] изучали изменения в модификациях гистонов, локализующихся в области промоторов генов *BRCA1* и *ESR1* (кодирует ЭР α), при действии фитоэстрогенов и эстрогенов. Используя метод иммунопреципитации хроматина, авторы обнаружили, что при воздействии генистеина, дэдзеина, эквола или E2 на промоторах генов *BRCA1* и *ESR1* снижен уровень модификаций гистона H3: H3K9me3 и H3K27me3, – ингибирующих транскрипцию, и увеличен уровень активирующих транскрипцию модификаций: H3K4ac и H4K8ac. Однако вне поля зрения авторов остались другие модификации гистонов, важные при регуляции ге-

нов, активируемых E2-ЭР α (ген *pS2*), такие как H3K14ac, H3K18ac, H3K23ac и H3R17me [56]. Несмотря на недостаточную изученность этой проблемы, можно предположить, что, по аналогии с промотором гена *pS2* в клетках MCF-7 РМЖ, в случае *BRCA1* (другого гена, активируемого E2-ЭР α) справедлива та же E2-зависимая активация промотора с участием ацетилтрансферазы гистонов CBP и Arg-специфичной метилтрансферазы гистонов CARM1 [56]. Более детально это выглядит так: под действием E2 гистоны H3, находящиеся на промоторе гена *BRCA1*, ацетируются вначале по Lys18 (H3K18ac), затем по Lys23 (H3K23ac) и, наконец, метилируются по Arg17 (H3R17me); при этом Lys14 может быть ацетилирован как в присутствии, так и в отсутствие E2-воздействия (H3K14ac) [56].

Обобщая сказанное, можно предложить несколько возможных механизмов наблюдаемой нами регуляции экспрессии *BRCA1* и ЭР α фитоэстрогенами. С одной стороны, фитоэстроген генистеин может активировать ЭР α , что приводит к формированию комплекса с ацетилтрансферазой гистонов CBP/p300, ацетилированию гистонов в области промотора гена *BRCA1* и к усилению синтеза мРНК и белка *BRCA1*. С другой стороны, генистеин, как ингибитор метилтрансфераз ДНК [57, 58], может снизить уровень гиперметилирования ДНК в промоторе *BRCA1* и тем самым индуцировать усиление транскрипции мРНК *BRCA1* и повышение уровня транслируемого с нее белка.

В результате проведенного нами исследования по воздействию гипоксии на экспрессию *BRCA1* и ЭР α в клетках MCF-7 выявлена тенденция к снижению экспрессии этих двух белков. Гипоксический цитотоксин TPZ не оказывал значительного влияния на индекс экспрессии *BRCA1* в условиях нормоксии. В условиях гипоксии обнаружено повышение экспрессии *BRCA1* под воздействием TPZ, который, активизируясь до цитотоксического радикала при снижении уровня кислорода, вызывает двухцепочечные разрывы ДНК. Это новые механизмы ответа злокачественных клеток на действие гипоксических цитотоксинов. Антиэстрогеновые эффекты TPZ в клетках РМЖ, обнаруженные при гипоксии, представляют большой интерес для дальнейших исследований. Нельзя исключить, что гипоксия влияет на *BRCA1*-ассоциированные процессы репарации ДНК и одновременно воздействует на гормональную регуляцию роста клеток РМЖ.

На основании полученных результатов по воздействию таких биологически активных соединений, как фитоэстрогены, эстрогены, антиэстрогены, на экспрессию *BRCA1* и ЭР α в клетках РМЖ можно сделать вывод, что изменения интегрального показателя экспрессии, индекса, происходили, в основном, за счет изменений интенсивности, а не уровня экспрессии целевого белка.

В условиях же гипоксии и под действием гипоксического цитотоксина TPZ, напротив, изменения индексов экспрессии *BRCA1* и ЭР α обусловлены в большей степени изменениями уровней, а не интенсивности их экспрессии. Иными словами, при воздействии фитоэстрогенов, эстрогенов и антиэстрогенов число клеток, экспрессирующих эти опухолевые маркеры, остается почти неизменным, но изменяется количество маркеров в уже экспрессирующих их клетках; и, напротив, при воздействии гипоксии и гипоксического цитотоксина TPZ изменяется число клеток, экспрессирующих *BRCA1* или ЭР α , и почти не меняется количество маркеров в уже экспрессирующих их клетках. В целом, в результате проведенного исследования выявлена координированная взаимосвязь *BRCA1*-ассоциированной репарации ДНК и сигнальных путей стероидных гормонов. Кроме того, показано, что в условиях гипоксии в клетках РМЖ одновременно снижаются гормональная зависимость пролиферации и роста клеток и экспрессия ключевого опухолевого супрессора *BRCA1*. В дальнейших исследованиях планируется установить роль этих молекулярных механизмов в формировании химиорезистентности опухолей со значительными гипоксическими регионами.

В заключение следует сказать, что полученные результаты послужат основой для последующего комплексного исследования молекулярных путей регуляции экспрессии маркера репарации ДНК, *BRCA1*, и маркера пролиферации, ЭР α , в том числе эпигенетической регуляции экспрессии их генов.

Исследование поддержано грантом РФФИ 18-29-09017 (эксперименты с клеточными культурами).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clark S., Rodriguez A.M., Snyder R.R., Hankins G.D.V., Boehning D. (2012) Structure-function of the tumor suppressor *BRCA1*. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **1**, 1–8. pii: e201204005
2. Silver D.P., Dimitrov S.D., Feunteun J., Gelman R., Drapkin R., Lu S.D., Shestakova E., Soundarapandian V., DeNunzio N., Dragomir S., Mar J., Liu X., Rotenberg S., Jonkers J., Ganesan S., Livingston D.M. (2007) Further evidence for *BRCA1* communication with the inactive X chromosome. *Cell*. **128**, 991–1002.
3. Hu Y., Scully R., Sobhian B., Xie A., Shestakova E., Livingston D.M. (2011) RAP80-directed tuning of *BRCA1* homologous recombination function at ionizing radiation-induced nuclear foci. *Genes Dev.* **25**, 685–700.
4. Saha J., Davis A.J. Unsolved mystery: the role of *BRCA1* in DNA end-joining. (2016) *J. Radiat. Res.* **57**, Suppl. 1, i18–i24.

5. Shestakova E.A. (2016) Epigenetic regulation of BRCA1 expression and its role in breast cancer stem cell development. *Turk. J. Biol.* **40**, 981–989.
6. Богуш Т.А., Шестакова Е.А., Вихлянцева Н.О., Богуш Е.А., Чемерис Г.Ю., Давыдов М.М. (2017) Эпигенетические механизмы регуляции *BRCA1*. *Онкогинекология*. **22**(2), 4–11.
7. Sokolenko A.P., Imyanitov E.N. (2017) Molecular tests for the choice of cancer therapy. *Curr. Pharm. Des.* **23**, 4794–4806.
8. Iyevleva A.G., Imyanitov E.N. (2016) Cytotoxic and targeted therapy for hereditary cancers. *Hered. Cancer Clin. Pract.* **14**, 17.
9. Hosking L., Trowsdale J., Nicolai H., Solomon E., Foulkes W., Stamp G., Signer E., Jeffreys A. (1995) A somatic BRCA1 mutation in an ovarian tumour. *Nat. Genet.* **9**, 343–344.
10. Esteller M., Silva J.M., Dominguez G., Bonilla F., Matias-Guiu X., Lerma E., Bussaglia E., Prat J., Harkes I.C., Repasky E.A., Gabrielson E., Schutte M., Baylin S.B., Herman J.G. (2000) Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 564–569.
11. Esteller M. (2006) CpG island methylation and histone modifications: biology and clinical significance. In: *Ernst Schering Research Foundation Workshop. The Histone Code and Beyond. New Approaches to Cancer Therapy*, vol. 57. Eds Berger S.L., Nakanishi O., Haendler B. Springer, pp. 115–126.
12. Lu Y., Chu A., Turker M.S., Glazer P.M. (2011) Hypoxia-induced epigenetic regulation and silencing of the BRCA1 promoter. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 3339–3350.
13. Wu Z.Q., Li X.Y., Hu C.Y., Ford M., Kleer C.G., Weiss S.J. (2012) Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with epigenetic Breast Cancer 1, Early Onset (BRCA1) repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**, 16654–16659.
14. McCoy M.L., Mueller C.R., Roskelley C.D. (2003) The role of the breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) in sporadic epithelial ovarian cancer. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **1**, 72.
15. Russel P.A., Pharoah P.D., De Foy K., Ramus S.J., Symmonds I., Wilson A., Scott I., Ponder B.A., Gayther S.A. (2000) Frequent loss of BRCA1 mRNA and protein expression in sporadic ovarian cancers. *Int. J. Cancer.* **87**, 317–321.
16. Ribeiro I.P., Marques F., Caramelo F., Pereira J., Patricio M., Prazeres H., Ferrao J., Juliao M.J., Castelo-Branco M., de Melo J.B., Baptista IP, Carreira IM. (2014) Genetic gains and losses in oral squamous cell carcinoma: impact on clinical management. *Cell Oncol. (Dordr.)*. **37**, 29–39.
17. Hosey A.M., Gorski J.J., Murray M.M., Quinn J.E., Chung W.Y., Stewart G.E., James C.R., Farragher S.M., Mulligan J.M., Scott A.N., Dervan P.A., Johnston P.G., Couch F.J., Daly P.A., Kay E., McCann A., Mullan P.B., Harkin D.P. (2007) Molecular basis for estrogen receptor alpha deficiency in BRCA1-linked breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 1683–1694.
18. Jeffy B.D., Hockings J.K., Kemp M.Q., Morgan S.S., Hager J.A., Beliakoff J., Whitesell L.J., Bowden G.T., Romagnolo D.F. (2005) An estrogen receptor- α 300 complex activates the BRCA-1 promoter at an AP-1 site that binds Jun/Fos transcription factors: repressive effects of p53 on BRCA-1 transcription. *Neoplasia*. **7**, 873–882.
19. Di L.J., Fernandez A.G., De Siervi A., Longo D.L., Gardner K. (2010) Transcriptional regulation of BRCA1 expression by a metabolic switch. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1406–1413.
20. Suba Z. (2015) DNA stabilization by the upregulation of estrogen signaling in BRCA gene mutation carriers. *Drug Des. Dev. Ther.* **9**, 2663–2675.
21. Ma Y., Fan S., Hu C., Meng Q., Fuqua S.A., Pestell R.G., Tomita Y.A., Rosen E.M. (2010) BRCA1 regulates acetylation and ubiquitination of estrogen receptor- α . *Mol. Endocrinol.* **24**, 76–90.
22. Petz L.N., Ziegler Y.S., Loven M.A., Nardulli A.M. (2002) Estrogen receptor alpha and activating protein-1 mediate estrogen responsiveness of the progesterone receptor gene in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology*. **143**, 4583–4591.
23. Schultz J.R., Petz L.N., Nardulli A.M. (2003) Estrogen receptor alpha and Sp1 regulate progesterone receptor gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* **201**, 165–175.
24. Petz L.N., Ziegler Y.S., Schultz J.R., Kim H., Kemper J.K., Nardulli A.M. (2004) Differential regulation of the human progesterone receptor gene through an estrogen response element half site and Sp1 sites. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **88**, 113–122.
25. Donaghue C., Westley B.R., May F.E.B. (1999) Selective promoter usage of the human estrogen receptor- α gene and its regulation by estrogen. *Mol. Endocrinol.* **13**, 1934–1950.
26. Andersson C., Sundberg M., Pristovsek N., Ibrahim A., Jonsson P., Katona B., Clausson C.M., Zieba A., Ramstrom M., Soderberg Williams C, Asplund A. (2017) Insufficient antibody validation challenges oestrogen receptor beta research. *Nat. Commun.* **8**, 15840.
27. Богуш Т.А., Попова А.С., Дудко Е.А., Богуш Е.А., Тюляндина А.С., Тюляндин С.А., Давыдов М.И. (2015) ERCC1 как маркер резистентности рака яичников к препаратам платины. *Антибиотики и химиотерапия*. **60**, 42–50.
28. Богуш Т.А., Дудко Е.А., Шестакова Е.А., Гришанина А.Н., Богуш Е.А., Кирсанов В.Ю., Рябини-на О.М., Вихлянцева Н.О. (2016) Количественная оценка уровня экспрессии белка BRCA1 в ткани рака молочной железы с использованием метода проточной цитофлуориметрии. *Рос. Биотерапевт. журн.* **15**, 49–52.
29. Богуш Т.А., Шатурова А.С., Дудко Е.А., Джураев Э.Э., Полоцкий Б.Е., Давыдов М.И. (2011) Количественная иммунофлуоресцентная оценка с использованием проточной цитофлуориметрии экспрессии эстрогеновых рецепторов β в солидных опухолях человека. *Вестник МГУ. Сер. 2. Химия*. **52**, 305–312.
30. Богуш Т.А., Шатурова А.С., Дудко Е.А., Богуш Е.А., Полоцкий Б.Е., Тюляндин С.А., Давыдов М.И. (2014) Сравнительная оценка экспрессии эстрогеновых рецепторов бета в ткани немелкоклеточного

- рака легкого и метастазов в легком опухолей других первичных локализаций. *ДАН*. **454**, 720–724.
31. Богуш Т.А., Дудко Е.А., Семаков А.В., Богуш Е.А., Тюляндина А.С., Заркуа В.Т., Тюляндин С.А., Давыдов М. И. (2014) Иммунофлуоресцентный анализ и оценка клинической значимости экспрессии ERCC1 в ткани рака яичников. *ДАН*. **457**, 481–486.
 32. Реброва О.Ю. (2002) *Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA*. М., МедиаСфера.
 33. Fan S., Meng Q., Auburn K., Carter T., Rosen E.M. (2006) BRCA1 and BRCA2 as molecular targets for phytochemicals indole-3-carbinol and genistein in breast and prostate cancer cells. *Br. J. Cancer*. **94**, 407–426.
 34. Dagdemir A., Durif J., Ngollo M., Bignon Y.J., Bernard-Gallon D. (2013) Histone lysine trimethylation or acetylation can be modulated by phytoestrogen, estrogen or anti-HDAC in breast cancer cell lines. *Epi-genomics*. **5**, 51–63.
 35. Bosviel R., Dumollard E., Dechelotte P., Bignon Y.J., Bernard-Gallon D. (2012) Can soy phytoestrogens decrease DNA methylation in BRCA1 and BRCA2 oncosuppressor genes in breast cancer? *OMICS*. **16**, 235–244.
 36. Ono M., Ejima K., Higuchi T., Takeshima M., Wakimoto R., Nakano S. (2017) Equol enhances apoptosis-inducing activity of genistein by increasing Bax/Bcl-xL expression ratio in MCF-7 human breast cancer cells. *Nutr. Cancer*. **6**, 1300–1307.
 37. Scherbakov A.M., Andreeva O.E. (2015) Apigenin inhibits growth of breast cancer cells: the role of ER α and HER2/neu. *Acta Naturae*. **7**, 133–139.
 38. Kaushik S., Shyam H., Sharma R., Balapure A.K. (2016) Genistein synergizes centchroman action in human breast cancer cells. *Indian J. Pharmacol.* **48**, 637–642.
 39. Messina M. (2014) Soy foods, isoflavones, and the health of postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* **100** (Suppl. 1), 423S–430S.
 40. Щербakov А.М., Вавилов Н.Э., Андреева О.Е., Тяглов Б.В., Миронов А.С., Шакулов Р.С., Лобанов К.В., Яроцкий С.В., Штиль А.А. (2017) Действие акадезина на клетки рака молочной железы в условиях гипоксии. *Успехи молекулярной онкологии*. **4**, 60–64.
 41. Sorokin D.V., Scherbakov A.M., Yakushina I.A., Semina S.E., Gudkova M.V., Krasil'nikov M.A. (2016) The mechanism of adaptation of breast cancer cells to hypoxia: role of AMPK/mTOR signaling pathway. *Bull. Exp. Biol. Med.* **160**, 555–559.
 42. Gilkes D.M. (2016) Implications of hypoxia in breast cancer metastasis to bone. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, E1669.
 43. Milani M., Harris A.L. (2008) Targeting tumour hypoxia in breast cancer. *Eur. J. Cancer*. **44**, 2766–2773.
 44. Lin W.H., Yeh S.H., Yeh K.H., Chen K.W., Cheng Y.W., Su T.H., Jao P., Ni L.C., Chen P.J., Chen D.S. (2016) Hypoxia-activated cytotoxic agent tirapazamine enhances hepatic artery ligation-induced killing of liver tumor in HBx transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **113**, 11937–11942.
 45. Ferrand N., Stragier E., Redeuilh G., Sabbah M. (2012) Glucocorticoids induce CCN5/WISP-2 expression and attenuate invasion in oestrogen receptor-negative human breast cancer cells. *Biochem. J.* **447**, 71–79.
 46. Rae J.M., Johnson M.D., Scheys J.O., Cordero K.E., Larios J.M., Lippman M.E. (2005) GREB 1 is a critical regulator of hormone dependent breast cancer growth. *Breast Cancer Res. Treat.* **92**, 141–149.
 47. Sun J., Zhou W., Kaliappan K., Nawaz Z., Slingerland J.M. (2012) ER α phosphorylation at Y537 by Src triggers E6-AP-ER α binding, ER α ubiquitylation, promoter occupancy, and target gene expression. *Mol. Endocrinol.* **26**, 1567–1577.
 48. Nawaz, Z., Lonard D.M., Dennis A.P., Smith C.L., O'Malley B.W. (1999) Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **96**, 1858–1862.
 49. Reid G., Hubner M.R., Metivier R., Brand H., Denger S., Manu D., Beaudouin J., Ellenberg J., Gannon F. (2003) Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ER α on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol. Cell*. **11**, 695–707.
 50. Stanisic V., Malovannaya A., Qin J., Lonard D.M., O'Malley B.W.J. (2009) OTU Domain-containing ubiquitin aldehyde-binding protein 1 (OTUB1) deubiquitinates estrogen receptor (ER) alpha and affects ER α transcriptional activity. *Biol. Chem.* **284**, 16135–16145.
 51. Prat A., Adamo B., Cheang M.C., Anders C.K., Carey L.A., Perou C.M. (2013) Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist*. **18**, 123–133.
 52. Hentze M.W. (1995) Translational regulation: versatile mechanisms for metabolic and developmental control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 393–398.
 53. Silvera D., Formenti S.C., Schneider R.J. (2010) Translational control in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. **10**, 254–66.
 54. Gudas J.M., Nguyen H., Li T., Cowan K.H. (1995) Hormone-dependent regulation of BRCA1 in human breast cancer cells. *Cancer Res.* **55**, 4561–4565.
 55. Fustier P., Corre L.L., Chalabi N., Vissac-Sabatier C., Communal Y., Bignon Y.J., Bernard-Gallon D.J. (2003) Resveratrol increases BRCA1 and BRCA2 mRNA expression in breast tumour cell lines. *Br. J. Cancer*. **89**, 168–172.
 56. Daujat S., Bauer U.M., Shah V., Turner B., Berger S., Kouzarides T. (2002) Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3. *Curr. Biol.* **12**, 2090–2097.
 57. Fang M.Z., Chen D., Sun Y., Jin Z., Christman J.K., Yang C.S. (2005) Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARbeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavons from soy. *Clin. Cancer Res.* **11**, 7033–7041.
 58. King-Batoon A., Leszczynska J.M., Klein C.B. (2008) Modulation of gene methylation by genistein or lycopene in breast cancer cells. *Environ. Mol. Mutagen.* **49**, 36–45.

BRCA1 AND ESTROGEN RECEPTOR α EXPRESSION REGULATION IN BREAST CANCER CELLS

A. M. Scherbakov¹, E. A. Shestakova^{1,*}, K. E. Galeeva¹, and T. A. Bogush¹

¹*Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 115478 Russia*

**e-mail: elenaanshestakova@mail.ru*

BRCA1 (breast cancer 1) protein is involved in the genome stability maintenance participating in homologous recombination-dependent DNA repair. Disruption of BRCA1 functioning is associated with breast and ovarian cancer. Despite the important role of BRCA1 in DNA repair in all cell types, the development of BRCA1-associated cancer takes place mainly in estrogen-dependent tissues such as breast and ovarian ones. Using breast cancer cell line MCF-7 it was demonstrated in *in vitro* experiments that the estrogen 17 β -estradiol (E2), phytoestrogens (genistein and apigenin) and antiestrogens (tamoxifen and fulvestrant) inhibited estrogen receptor α (ER α) expression while only genistein influenced BRCA1 increasing its expression. In hypoxia, that is an important factor of solid tumors progression, the decrease of BRCA1 and ER α expression was demonstrated in MCF-7 cells. Therefore, hypoxia influences both BRCA1-dependent DNA repair and hormonal regulation of breast cancer cell growth. Taken together, obtained results demonstrate a relationship between BRCA1 and steroid hormones signal transduction pathways in breast cancer cells and point out to the importance of complex BRCA1 and ER α expression regulation mechanisms studies including epigenetic gene expression regulation.

Keywords: BRCA1 protein, estrogen receptors, breast cancer, MCF-7, flow cytometry, hypoxia, phytoestrogens, estrogens