

УДК 616.5-006.81.04:576.08

FOXС1-ОПОСРЕДОВАННОЕ ВЛИЯНИЕ микроРНК miR-204-5p НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ

© 2021 г. И. Ю. Дубовцева^а, М. Б. Аксененко^а, Е. Д. Николаева^а, А. С. Аверчук^а,
А. В. Мошев^с, А. А. Савченко^с, С. В. Маркова^б, Т. Г. Рукша^{а, *}

^аКрасноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства
здравоохранения России, Красноярск, 660022 Россия

^бИнститут биофизики Сибирского отделения Российской академии наук, обособленное подразделение Федерального
исследовательского центра “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”,
Красноярск, 660022 Россия

^сНаучно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, Красноярск, 660022 Россия

*e-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

Поступила в редакцию 17.08.2020 г.

После доработки 24.10.2020 г.

Принята к публикации 11.11.2020 г.

МикроРНК эпигенетически регулируют физиологические и патологические процессы. Ранее нами выявлено, что микроРНК miR-204-5p низко экспрессирована в клетках меланомы, а повышение ее уровня приводит к изменению пролиферации, миграции и инвазии этих раковых клеток. Теперь с помощью биоинформатического анализа показано, что мишень miR-204-5p — мРНК, кодирующая транскрипционный фактор FOXС1, играющий важную роль в канцерогенезе. С помощью люциферазной репортерной системы обнаружено, что miR-204-5p подавляет экспрессию гена FOXС1 посредством связывания с его 3'-некодирующей областью. Трансфекция малой интерферирующей РНК (siРНК), нацеленной на FOXС1, в клетки меланомы вызывала снижение уровня miR-204-5p, что согласуется с общепринятыми представлениями о регуляции экспрессии микроРНК генами-мишенями по принципу обратной связи. По результатам МТТ-теста и флуоресцентной микроскопии, уровень пролиферации клеток меланомы под действием siРНК к FOXС1 снижался через 72 ч после трансфекции. Методом проточной цитометрии проанализированы изменения в соотношении клеток по фазам клеточного цикла. Выявлены регуляторные взаимосвязи между FOXС1 и miR-204-5p, а также ингибирующий эффект нокдауна FOXС1 на пролиферацию клеток меланомы. На основании полученных результатов можно предположить, что miR-204-5p регулирует пролиферацию клеток меланомы через воздействие на экспрессию FOXС1.

Ключевые слова: FOXС1, miR-204-5p, меланома, BRO, SK-MEL-2, siРНК, микроРНК, опухолевые дормантные клетки

DOI: 10.31857/S0026898421030058

Резистентность опухолей к терапевтическим средствам относится к одной из важнейших проблем современной онкологии. Это обусловлено многими факторами, в том числе гетерогенностью опухолевой ткани и возможным наличием в ней пула дормантных (спящих, G₀) клеток в пределах одной опухоли. Неизвестно, на каком этапе канцерогенеза формируются дормантные клетки [1], однако они способны сохраняться в организме после проведения противоопухолевой терапии, циркулировать с кровотоком и оседать в других органах и тканях, принимая участие в развитии метастазирования [2]. Молекулярные механизмы активации (трансформации в пролиферирующие опухолевые клетки) дормантных клеток, перехода из G₀ в G₁, не поняты до конца. Предполагается,

что в этом процессе принимают участие компоненты системы иммунного надзора, опухолевого микроокружения, а также эпигенетические регуляторы, в том числе микроРНК.

МикроРНК представляют собой короткие (20–24 н.) некодирующие РНК, которые вовлечены в посттранскрипционную регуляцию генной экспрессии. МикроРНК, транскрибируемые с геномной ДНК и подвергающиеся дальнейшему процессингу и экспорту в цитоплазму [3, 4], играют важную роль в регуляции многих физиологических и патологических процессов [5]. Ранее нами показано, что микроРНК miR-204-5p — одна из низкоэкспрессируемых микроРНК в клетках меланомы, но не в меланоцитарных невусах [6]. Выявлено, что восстановление уровня miR-204-5p в опухо-

левых клетках приводит к изменению скорости их пролиферации, миграции и инвазии [7]. Кроме того, недавно Díaz-Martínez и соавт. [8] обнаружили, что восстановление экспрессии miR-204-5p в клетках меланомы вызывает потерю резистентности к противоопухолевому таргетному препарату вемурафенибу. Авторы предложили разные возможные механизмы этого явления, в том числе воздействие miR-204-5p на регуляторы клеточного цикла и апоптоза. Мы предположили, что miR-204-5p не только напрямую участвует в регуляции хода клеточного цикла, но влияет и на переход клеток в покоящееся состояние, G₀. Дело в том, что одна из причин резистентности клеток к противоопухолевым средствам связана именно с опухолевыми клетками, находящимися в фазе G₀ и поэтому не чувствительными к действию агентов, подавляющих пролиферацию.

Нами исследованы механизмы регуляции пролиферации клеток меланомы под действием микроРНК miR-204-5p.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток меланомы. Эксперименты проводили на клетках меланомы человека BRO (предоставлена ФГБНУ “НИИ фундаментальной и клинической иммунологии”, Новосибирск, Россия) и SK-MEL-2 (“Биолот”, Россия). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с L-глутамином (“ПанЭко”, Россия) с 10%-ной фетальной сывороткой крупного рогатого скота (FBS; “Gibco, Thermo Fisher Scientific”, США) при 37°C и 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе Sanyo MSO-5AC (“Sanyo Electric Co., Ltd.”, Япония).

Биоинформатический анализ. Поиск и анализ генов-мишеней miR-204-5p проведен с использованием четырех баз данных и программ TargetScan (версия 7.0; <http://www.targetscan.org>), miRDB (версия 5.0; <http://mirdb.org/miRDB>), miRWalk 2.0 (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>) и miRTarBase (версия 4.5; <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>). Рассматривали гены-мишени miR-204-5p, которые встречались во всех четырех базах данных. На следующем этапе были выделены гены-мишени, значения TargetScore (вероятность, выведенная из распределения генов-мишеней микроРНК при помощи логарифмической модели Байеса—Гаусса) которых в базе miRDB были не ниже 80. Это связано с тем, что все гены-мишени распределены особым алгоритмом по баллам прогноза от 50 до 100. Для оценки роли miR-204-5p в регуляции внутренней сигнализации с помощью программы PANTHER v10.0 (www.pantherdb.org) проведен анализ изменяемых в клетках метаболических и сигнальных каскадов.

Проектирование siРНК для нокдауна FOXC1. Подбор последовательностей siРНК и скрем-

блированных РНК для отрицательного контроля проводили с использованием программы siDirect 2 (<http://sidirect2.rnai.jp>); siРНК подбирали с помощью программы Wizard Software v.3.1. (“Invitrogen, Thermo Fisher Scientific”, США).

Критериями для отбора были следующие параметры: содержание G/C нуклеотидов 35–55%, последовательность размером 20–25 н., отсутствие транскриптов других генов, совпадающих с последовательностями выбранных siРНК, по результатам анализа с помощью системы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Отобранные последовательности не содержали более трех одинаковых нуклеотидов подряд и нуклеотидных повторов. Для оценки специфичности нокдауна в клетках в качестве отрицательного контроля использовали скремблированные siРНК.

Синтез смысловых скремблированных siРНК проведен компанией ООО “Синтол” (Россия):

FOXC1_sense siРНК: 5'-GGGAAUAGUAGCU-GUCAAATTdTdT-3';

FOXC1_scramble siРНК: 5'-GGAATGGTAGCGA-CATATATT-3'.

Трансфекцию siРНК в клетки меланомы BRO и SK-MEL-2 выполняли при достижении клетками плотности 70%.

Оценка жизнеспособности клеток меланомы. Для оценки пролиферации клеток меланомы BRO и SK-MEL-2 использовали МТТ-тест. Клетки культивировали в 96-луночной планшете без вмешательств 24 ч и по достижении концентрации 1×10^4 клеток в 100 мкл питательной среды их трансфицировали siРНК к FOXC1. Трансфекцию проводили при помощи Lipofectamine 3000 (“Thermo Fisher Scientific”) согласно инструкции производителя. Через 24 ч питательную среду удаляли, в каждую лунку добавляли раствор 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид (МТТ) (“Invitrogen, ThermoFisher Scientific”) в концентрации 5 мг/мл, в количестве 15 мкл МТТ на 135 мкл питательной среды. Клетки с раствором МТТ инкубировали 4 ч при 37°C и 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе. По интенсивности накопления формазана оценивали метаболическую активность клеток, соответствующую интенсивности пролиферации, через сутки, двое и трое суток после трансфекции. Измерения проводили на спектрофотометре Efes-9305 (“Shvabe Photosystems”, Россия) при длине волны 560 нм. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, трансфицированные скремблированной siРНК. Эксперимент проводили в трех технологических повторах. Данные нормировали на соответствующие значения в контроле и выражали в процентах.

Флуоресцентная микроскопия. Для проведения флуоресцентной микроскопии клетки BRO

и SK-MEL-2, трансфицированные siРНК в концентрации 5×10^4 клеток/мл, рассеивали в 96-луночный планшет и инкубировали 24 ч при 37°C и 5% CO₂. Через 24, 48 и 72 ч клетки окрашивали с использованием набора реагентов CyQUANT Direct Cell Proliferation Assay ("Thermo Fisher Scientific"), в состав которого входит зеленый флуоресцентный краситель, напрямую связывающийся с ДНК. После 30-минутной инкубации при комнатной температуре проводили флуоресцентную микроскопию с использованием системы визуализации клеток Flouid® Cell Imaging Station (Flouid Software, версия 22809; "Thermo Fisher Scientific") при увеличении $\times 460$. Подсчет клеток проводили в 10 полях зрения. Ядра пролиферирующих клеток окрашивались в зеленый цвет, ядра живых непролиферирующих клеток оставались неокрашенными. Эксперимент проводили в трех технологических повторах.

Люциферазная репортерная система для оценки воздействия микроРНК. Для подтверждения FOXCI как функционально значимого гена-мишени miR-204-5p в клетках меланомы использовали люциферазную репортерную систему Ambion® pMIR-REPORT Luciferase miRNA Expression Reporter Vector System ("Invitrogen™, Applied Biosystems", США). Прежде всего была синтезирована нуклеотидная последовательность 3'-некодирующей области (3'-UTR) гена FOXCI, содержащая предсказанный сайт-мишень для miR-204-5p. Затем синтезированный фрагмент ДНК клонировали в 3'-UTR гена люциферазы светлячка (*Rluc*) в репортерной плазмиде pMIR-REPORT согласно инструкции производителя. Корректность полученной конструкции подтверждена секвенированием. В полученной плазмиде экспрессия люциферазного репортера подвергается регуляции, которая имитирует регуляцию FOXCI через анализируемую область с сайтом-мишенью микроРНК. Вторую нормировочную плазмиду системы pMIR-REPORT-β-gal, содержащую ген β-галактозидазы (*GALB*), использовали как внутренний стандарт для нормирования сигнала с целью устранения возможных различий в трансфекционной эффективности отдельных образцов. Плазмиду pMIR-REPORT-β-gal добавляли при трансфекции в соотношении 1 : 10. Трансфекцию полученной конструкции осуществляли в клетки меланомы линии BRO и SK-MEL-2 при помощи Lipofectamine 3000 ("Thermo Fisher Scientific"). Отрицательными контролями служили не трансфицированные клетки меланомы BRO и SK-MEL-2, не содержащая последовательность 3'-UTR гена FOXCI плазмидная ДНК, трансфицированные только синтетическим аналогом (миметиком) miR-204-5p, mirVana®miRNA ("Ambion", "Thermo Fisher Scientific"), клетки с конечным содержанием миметика 30 нМ.

Эффективность трансфекции оценивали прямым подсчетом флуоресцирующих клеток под микроскопом после трансфекции контрольной плазмидой pcDNA3m3-cgreGFP2 (несущей ген *gfp Clytia gregaria*, мутированный для созревания при 37°C) в концентрации, равной таковой для исследуемой плазмиды (GFP-вектор предоставлен лабораторией фотобиологии Института биофизики СО РАН, обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия).

Люциферазную активность клеток меланомы анализировали через 24 ч после трансфекции с использованием набора Dual-Light® Systems ("Applied Biosystems"). Клетки лизировали и, согласно инструкции производителя, добавляли в лизат буфер А, субстрат β-галактозидазы Galacton-Plus® в разведении 1 : 100 в буфере В, в состав которого входил субстрат люциферазы люциферин. Ферментативную активность люциферазы и β-галактозидазы измеряли на планшетном люцинометре Mithras LB 940 Multimode Reader ("Berthold Technologies GmbH & Co", Германия) при длине волны 560 нм для люциферазы и 420 нм для β-галактозидазы. Относительную люциферазную активность, отражающую уровень экспрессии FOXCI, рассчитывали по соотношению интенсивности люминесценции продукта люциферазной реакции к таковой для продукта реакции β-галактозидазы в каждой лунке.

Оценка эффекта вемурафениба на пролиферацию клеток меланомы. Концентрацию 50%-ного ингибирования (IC₅₀) пролиферации клеток меланомы определяли при помощи МТТ-теста. Клетки меланомы BRO и SK-MEL-2 культивировали в 96-луночном планшете 24 ч до достижения концентрации 2×10^5 клеток в 500 мкл питательной среды RPMI-1640 с L-глутамином и 10% FBS, после чего в лунки вносили вемурафениб ("Carbosynth Ltd", Англия), растворенный в DMSO ("Panreac quimica SA", Испания), в конечной концентрации 0.75, 1.25, 2.5, 5.0 и 10.0 мкМ. В качестве контроля использованы клетки с DMSO в концентрации, соответствующей таковой в 5.0 мкМ вемурафенибе. Клетки культивировали в течение 72 ч, после чего питательную среду удаляли и вносили в каждую лунку 135 мкл свежей питательной среды и 15 мкл раствора МТТ с концентрацией 5 мг/мл. Планшет помещали в CO₂-инкубатор на 4 ч при 37°C и 5% CO₂. Метаболическую активность клеток оценивали спектрофотометрически и рассчитывали по формуле: $(OD_s/OD_m) \times 100\%$, — где значения OD_s и OD_m соответствуют оптической плотности клеток экспериментального и контрольного образца при длине волны 560 нм. Оптическую плотность определяли на спектрофотометре Anthos 2010 ELISA ("Biochrom Ltd", Англия). Значение IC₅₀ рассчитывали с использованием программного обеспечения Graphpad

PRISM 8.0. Эксперимент проводили в трех технологических повторах.

Дормантные клетки выделяли по методу, описанному ранее [9], с применением противоопухолевого агента вемурафениба в концентрации 10 IC₅₀. Клетки культивировали 3 суток, заменяли питательную среду на свежую и культивировали еще 48 ч, после чего, используя Lipofectamine 3000, проводили трансфекцию siРНК для подавления экспрессии *FOXCI*.

Определение доли клеток, находящихся в фазе G₀, методом проточной цитометрии. После инкубации с вемурафенибом клетки меланомы BRO и SK-MEL-2 в концентрации 3×10^5 клеток/лунка снимали с 6-луночного планшета буфером трипсин-EDTA (“ПанЭко”), центрифугировали при $10000 \times g$ на центрифуге miniSpin (“Ependorf”, Германия) в течение 5 мин и удаляли надосадочную жидкость. Клеточную суспензию фиксировали метиловым спиртом (70–100%). Для этого 0.5 мл метилового спирта добавляли к полученному осадку и инкубировали в течение 30 мин. Для пермеабилзации фиксированных клеток использовали обработку тритоном X-100 в течение 15 мин. После каждого этапа клетки промывали дважды фосфатно-солевым буфером (PBS). Клетки окрашивали анти-Ki-67-моноклональными антителами, конъюгированными с FITC (#11-5698-82, “eBioscience™”, “Thermo Fisher Scientific”) в разведении 1 : 200 в FBS. По завершении процедуры окрашивания в образцы вносился ДНК-связывающий краситель — йодистый пропидий (PI) (“Thermo Fisher Scientific, Inc.”, Нидерланды) — до концентрации 100 мкг/мл и инкубировали в течение 15 мин.

Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Navios (“Beckman Coulter, Inc.”, США) Центра коллективного пользования КНЦ СО РАН с использованием синего лазера (488 нм) и детекторных фильтров. Полоса пропускания для FITC составляла 530/30 нм, а для PI — 610/20 нм.

Результаты анализировали с использованием программы Navios Software v. 1.2 и Kaluza v. 2.1.1 (“Beckman Coulter, Inc.”); при этом в каждом образце исследовали не менее 50000 клеток. Гейтирование клеток, находящихся на разных стадиях клеточного цикла, выполняли в логарифмическом режиме. Для клеток, находящихся в фазе G₀, характерна Ki-67-негативность и низкие уровни PI-сигнала. В этой связи гейтирование клеток в G₀-фазе оценивали в диапазоне до 10 по шкале флуоресценции Ki-67-FITC (отрицательный результат) и в диапазоне 0.7–1.3 относительных единиц флуоресценции по PI.

Определение уровня экспрессии miR-204-5p в клетках меланомы. Реакцию обратной транскрипции проводили с применением набора реагентов

MMLV RT kit (“Евроген”, Россия). Для синтеза кДНК использовали набор случайных праймеров из MMLV RT kit (“Евроген”) и специфичные праймеры для микроРНК TaqMan Assays hsa-miR-204-5p (No A25576, “Applied Biosystems™”, “Thermo Fisher Scientific”).

Уровень экспрессии miR-204-5p определяли методом ПЦР в реальном времени, используя амплификатор StepOne™ Real-Time PCR System (“Applied Biosystems”, “Thermo Fisher Scientific”), с 40 циклами амплификации. В качестве эндогенных контролей использовали малые ядерные РНК (snРНК) RNU6A и RNU6B (“Applied Biosystems”). Эксперимент проводили в трех повторах. Для анализа данных использовали метод $\Delta\Delta CT$.

Статистическая обработка. Статистическую значимость полученных различий рассчитывали с использованием критерия Стьюдента и *U*-теста Манна–Уитни в программном пакете для статистического анализа Statistica 12.0 (“StatSoft”, Россия). Результаты считались значимыми при $p < 0.05$. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения (SD).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Идентификация FOXCI как возможной мишени miR-204-5p

В результате проведенного биоинформатического анализа для miR-204-5p выявлено 235 генов-мишеней. По четырем примененным базам данных выявлено 36 общих генов, из которых 13 участвует в регуляции пролиферации клеток. Последующий анализ генных онтологий биологических процессов и молекулярных функций при помощи системы PANTHER v10.0 позволил из 13 вышеуказанных генов идентифицировать те, биологические функции которых связаны с процессом клеточной пролиферации: *SIRT1* (sirtuin 1), *FOXCI* (forkheadbox C1), *TGFBR1* (transforming growth factor beta receptor 1) и *USP47* (ubiquitin specific peptidase 47).

Анализ последовательности *FOXCI* человека (NM_001453) показал, что 3'-UTR его мРНК содержит участки с высокой степенью комплементарности нуклеотидов к последовательности miR-204-5p. На основании этих данных можно было предположить, что идентифицированная последовательность в составе мРНК *FOXCI* представляет собой сайт связывания miR-204-5p, причем с сильным регуляторным эффектом (рис. 1).

Исследование FOXCI как прямой мишени miR-204-5p

Для подтверждения *FOXCI* как функционально значимого гена-мишени miR-204-5p мы оценили регуляторную активность этой микроРНК,

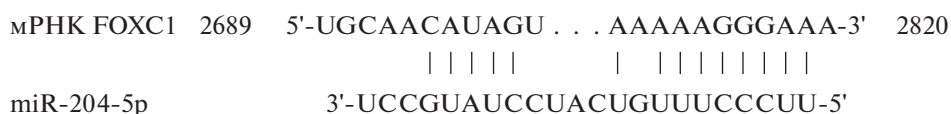


Рис. 1. Предсказанное связывание miR-204-5p с 3'-UTR мРНК FOXCI (Homo sapiens forkhead box C1; Gene ID 2296).

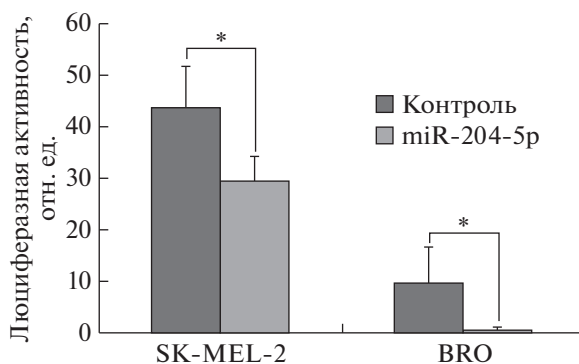


Рис. 2. Относительная люциферазная активность в клетках меланомы SK-MEL-2 и BRO через 48 ч после трансфекции миметика miR-204-5p. * $p = 0.005$.

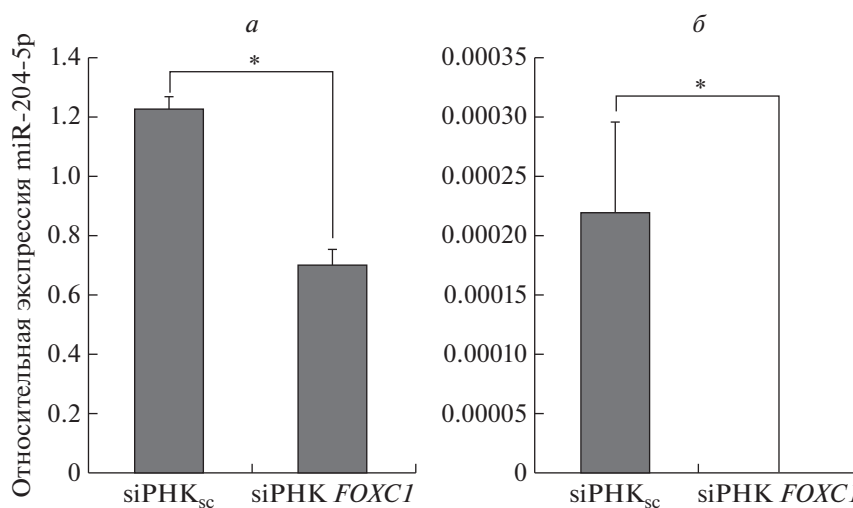


Рис. 3. Экспрессия miR-204-5p в клетках меланомы SK-MEL-2 (а) и BRO (б), трансфицированных siPHK к FOXCI. Уровень экспрессии miR-204-5p рассчитывали относительно экспрессии RNU6A и RNU6B до и после воздействия siPHK FOXCI. Здесь и на других рисунках: siPHK_{sc} — скремблированная siPHK; * $p < 0.05$.

используя люциферазную репортерную конструкцию, содержащую 3'-UTR гена FOXCI с сайтом-мишенью для miR-204-5p. Обнаружено, что miR-204-5p ингибировала люциферазную активность репортерной системы на 72% в клетках меланомы линии BRO и на 34% в клетках меланомы линии SK-MEL-2 (рис. 2). Из этого можно сделать вывод, что miR-204-5p действительно подавляет экспрессию FOXCI.

Кроме того, нами исследовано влияние siPHK к FOXCI, трансфицированной в клетки меланомы, на экспрессию miR-204-5p. Обнаружено, что

в этом случае уровень miR-204-5p снижался в клетках BRO до 0, а в клетках SK-MEL-2 с 1.23 до 0.64 (рис. 3).

Снижение уровня FOXCI в клетках меланомы сопровождается снижением пролиферативной активности

Нами исследовано влияние трансфекции siPHK FOXCI в клетки меланомы на уровень их пролиферации. По данным МТТ-теста, через 72 ч после трансфекции жизнеспособность клеток BRO и

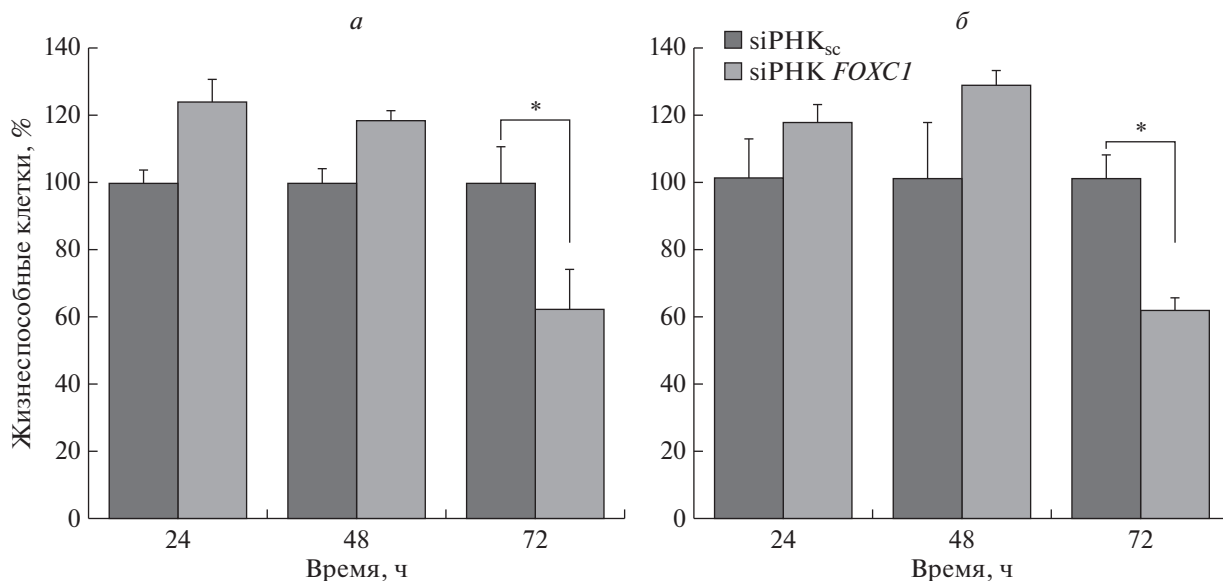


Рис. 4. Жизнеспособность клеток меланомы BRO (а) и SK-MEL-2 (б) через 24, 48 и 72 ч после трансфекции siRNA *FOXC1*. Жизнеспособность клеток определяли в МТТ-тесте; за 100% принята пролиферативная активность контрольных клеток.

SK-MEL-2 снижалась на 39 и 40% соответственно по сравнению с контрольными клетками, трансфицированными скремблированной siRNA (рис. 4).

Аналогичные данные получены и методом иммунофлуоресцентной микроскопии: через 72 ч после трансфекции пролиферация клеток BRO и SK-MEL-2 снижалась соответственно в 2.7 и 1.5 раза (рис. 5). Таким образом, логично предположить, что ген *FOXC1* — мишень miR-204-5p, а индуцируемое этим взаимодействием снижение уровня тран-

скрипционного фактора *FOXC1* приводит к изменению скорости пролиферации клеток меланомы.

Влияние вемурафениба и siRNA к *FOXC1* на экспрессию miR-204-5p

Нами проанализировано влияние на пролиферацию клеток меланомы противоопухолевого средства вемурафениба. Это соединение относится к группе таргетных препаратов, нацеленных на мутантный белок BRAF — компонент сигнального каскада MAPK [10]. Известно, что опухолевые клетки в пределах одной опухоли могут быть гетерогенны по мутационному статусу. Индуцируя апоптоз в BRAF-позитивных клетках, BRAF-негативные клетки могут сохранять жизнеспособность, в том числе находясь или переходя в состояние покоя — фазу G₀. Показано, что применение цитостатических средств может способствовать переходу опухолевых клеток в фазу G₀ [11]. Учитывая эти данные, мы проанализировали действие BRAF-ингибитора вемурафениба (в концентрации 10 IC₅₀) на клетки SK-MEL-2. Методом проточной цитометрии установлено, что при обработке вемурафенибом доля Ki-67-негативных клеток увеличивается с 7 до 35%, в то время как уровень miR-204-5p снижается на 65%. Как видно из данных, приведенных на рис. 6, трансфекция siRNA *FOXC1* в эти клетки не предотвращала снижения уровня miR-204-5p (рис. 6), а через 72 ч после ее трансфекции регистрировали снижение пролиферативной активности клеток (табл. 1).

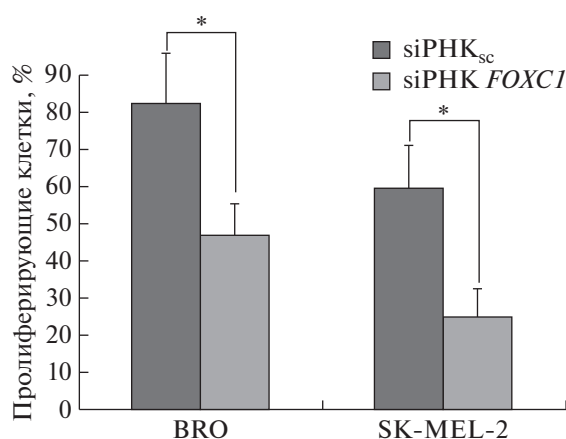


Рис. 5. Пролиферативная активность клеток меланомы BRO и SK-MEL-2 через 72 ч после трансфекции siRNA *FOXC1* по результатам флуоресцентной микроскопии на основе визуализации живых, пролиферирующих, неповрежденных клеток с помощью ДНК-связывающего красителя по технологии CyQUANT Direct Cell Proliferation Assay.

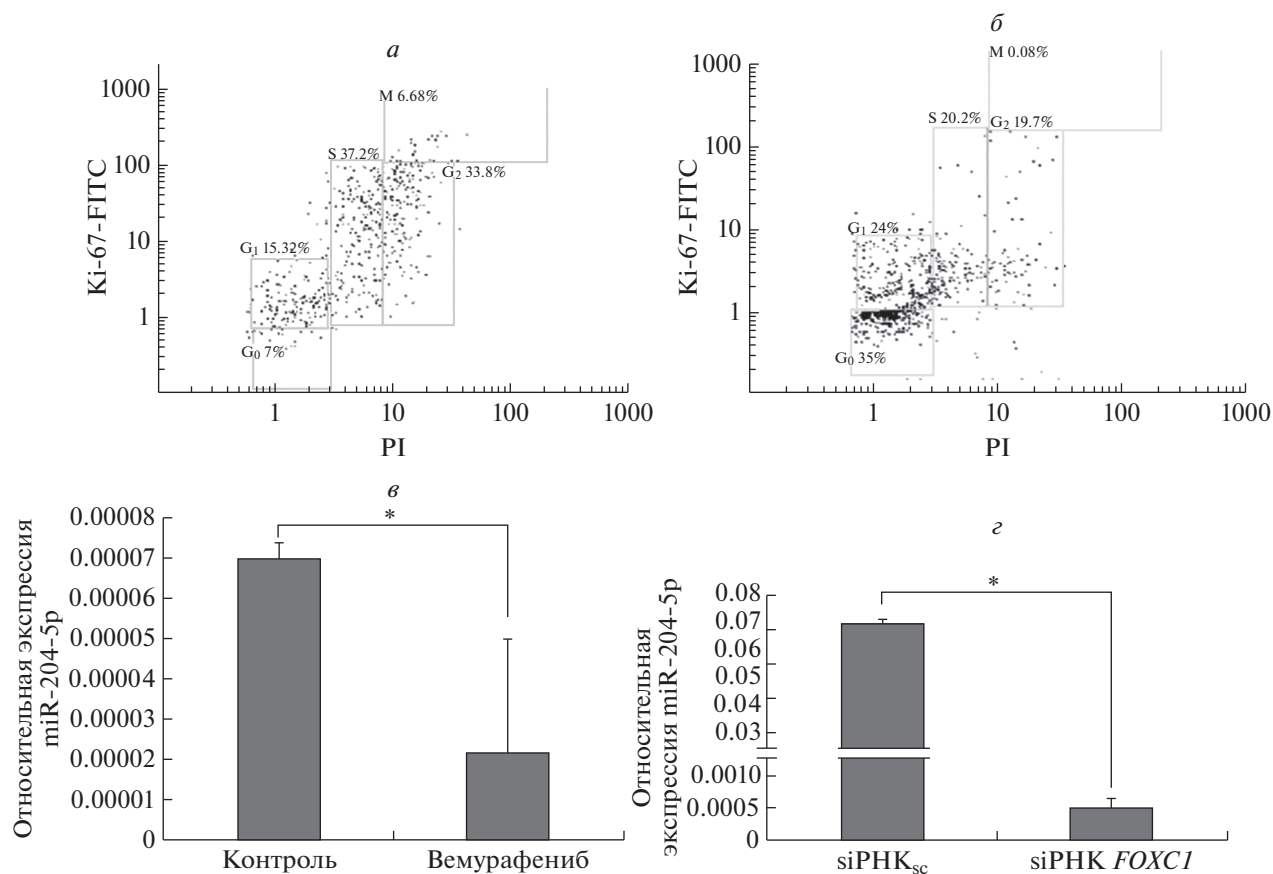


Рис. 6. Уровень G_0 -положительных клеток SK-MEL-2 до (а) и после (б) обработки вемурафенибом: положительные клетки локализованы в нижнем квадрате диаграмм. Уровень miR-204-5p в клетках SK-MEL-2 после обработки вемурафенибом (в) и трансфекции siРНК к FOXС1 (д).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее показано, что при меланоме, по сравнению с доброкачественными меланоцитарными невусами, сильно снижена экспрессия микроРНК miR-204-5p [5, 12]. Опираясь на данные по участию miR-204-5p в регуляции пролиферации клеток плоскоклеточного рака, рака молочной

железы [13, 14], мы предположили, что эта микроРНК участвует и в регуляции пролиферации клеток меланомы.

В результате проведенного биоинформатического анализа идентифицированы возможные гены-мишени miR-204-5p, вовлеченные в регуляцию пролиферации клеток. Один из таких генов — FOXС1. Кодимый этим геном белок FOXС1 — транскрипционный фактор, участвующий в развитии тканей и органов, включая кожу. Измененная экспрессия FOXС1 описана для клеток рака молочной железы [14], эндометрия [15], поджелудочной железы [16]. FOXС1 входит в семейство транскрипционных факторов forkhead box (FOX), представляющее собой группу эволюционно консервативных регуляторов транскрипции, имеющих общий ДНК-связывающий домен [17]. Члены этого семейства играют важную роль как в физиологических процессах, так и при канцерогенезе, влияя на метаболизм, развитие, дифференцировку, пролиферацию, апоптоз, миграцию и инвазию опухолевых клеток [18]. Также показано, что в клетках меланомы сигнальный каскад MST1R/PI3K/AKT активируется посредством избыточной экспрес-

Таблица 1. Жизнеспособность обработанных вемурафенибом клеток меланомы SK-MEL-2, трансфицированных siРНК FOXС1

Время, ч	Содержание жизнеспособных клеток ^а , %	
	siРНК _{sc}	siРНК FOXС1
24	100.00 ± 7.87	116.00 ± 19.86
48	100.00 ± 21.20	127.60 ± 36.64
72	100.00 ± 19.50	60.95 ± 0.68 ^б

^аЖизнеспособность контрольных клеток (после воздействия вемурафениба) принята за 100%. Жизнеспособность этих же клеток, трансфицированных siРНК FOXС1, нормирована на контроль и выражена в процентах как среднее ± SD. ^б $p = 0.0024$.

сии *FOXCI*, что приводит к усилению их пролиферации, миграции, инвазии [19]. Более того, известно, что *FOXCI* регулирует формирование мезенхимальных ниш для гемопоэтических стволовых клеток [20].

Для доказательства функционирования *FOXCI* в качестве регуляторной мишени *miR-204-5p* нами создана генетическая конструкция со встроенным фрагментом гена *FOXCI*. По результатам анализа люциферазной активности клеток, экспрессирующих ген-репортер и *miR-204-5p*, выявлено, что под действием *miR-204-5p* экспрессия белка-репортера снижается. Следовательно, *miR-204-5p* регулирует экспрессию *FOXCI*, по-видимому, связываясь с комплементарной последовательностью мРНК *FOXCI*. Следует заметить, что снижение люциферазной активности различалось в двух исследуемых типах клеток меланомы, но достоверно было не ниже 25%, на основании чего можно говорить о специфичности действия *miR-204-5p*. Таким образом, ген *FOXCI* может быть мишенью и регулироваться *miR-204-5p*. Этот вывод подтвержден и результатами проведенного нами анализа влияния *siРНК* к *FOXCI* на экспрессию *miR-204-5p*. Показано, что при трансфекции клеток меланомы *siРНК* к *FOXCI* уровень *miR-204-5p* снижался, что может быть обусловлено присущей генам-мишеням способностью регулировать уровень экспрессии микроРНК по принципу обратной связи [21]. Таким образом, *FOXCI* регулирует пролиферацию клеток меланомы, будучи, в свою очередь, функциональной мишенью *miR-204-5p*. Известно, что *FOXCI*, воздействуя на циклины *CDK1*, *CDK2*, *CDK4* и *CDK6*, влияет на сигнальный каскад *PI3K/AKT* и тем самым на прохождение клеточного цикла [22].

Установлено, что снижение уровня *FOXCI* вызывает угнетение пролиферации, а эктопическая экспрессия *FOXCI* в опухолевых клетках индуцирует арест перехода из фазы G_0 в G_1 [23]. Для повышения доли клеток, находящихся в фазе G_0 , мы использовали *BRAF*-негативные клетки, обработанные вемурафенибом. Показано, что вемурафениб индуцировал увеличение доли клеток, находящихся в состоянии покоя, что сопровождалось снижением экспрессии *miR-204-5p*. Этот результат согласуется с данными Vitiello и др. [24] о влиянии вемурафениба на экспрессию *miR-204-5p*. Авторы показали, что обработка вемурафенибом *BRAF*-негативных клеточных линий MeWo и SK-Mel-197 не приводила к повышению экспрессии *miR-204-5p*.

Следует сказать, что при сочетанном воздействии на клетки меланомы вемурафениба и *siРНК* к *FOXCI* снижался как уровень *miR-204-5p*, так и пролиферативная активность клеток. Это косвенно подтверждает наличие регуляторной взаимосвязи между микроРНК *miR-204-5p* и

ее мишенью — *FOXCI*. Возможно, что при меланоме кожи *miR-204-5p*, воздействуя через экспрессию *FOXCI* на сигнальный каскад *PI3K/AKT*, модулирует активность циклинов и прохождение клеточного цикла, вовлечена в функционирование клеток, находящихся в состоянии покоя, препятствуя эффективному ответу на действие противоопухолевого препарата.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-15-00110).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schardt J.A., Meyer M., Hartmann C.H., Schubert F., Schmidt-Kittler O., Fuhrmann C., Polzer B., Petronio M., Eils R., Klein C.A. (2005) Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer. *Cancer Cell*. **8**, 227–239.
2. Lim P.K., Bliss S.A., Patel S.A., Taborga M., Dave M.A., Gregory L.A., Greco S.J., Bryan M., Patel P.S., Rameshwar P. (2011) Gap junction-mediated import of microRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells. *Cancer Res*. **71**, 1550–1560.
3. Wang Z. (2010) MicroRNA: a matter of life or death. *World J. Biol. Chem.* **1**, 41–54.
4. Chen Z., Li Z., Soutto M., Wang W., Piazuolo M.B., Zhu S., Guo Y., Maturana M.J., Corvalan A.H., Chen X., Xu Z., El-Rifai W. (2018) Integrated analysis of mouse and human gastric neoplasms identifies conserved microRNA networks in gastric carcinogenesis. *Gastroenterology*. **28**, 46–52.
5. Аушев В.Н. (2015) МикроРНК: малые молекулы с большим значением. *Клин. онкогематол.* **8**, 1–12.
6. Palkina N., Komina A., Aksenenko M., Moshev A., Savchenko A., Ruksha T. (2018) MiR-204 and miR-3065 exert antitumor effect on melanoma cells. *Oncol. Lett.* **15**, 8269–8828.
7. Toda H., Kurozumi S., Kijima Y., Idichi T., Shinden Y., Yamada Y., Arai T., Maemura K., Fujii T., Horiguchi J., Natsugoe S., Seki N. (2018) Molecular pathogenesis of triple-negative breast cancer based on microRNA expression signatures: antitumor miR-204-5p targets AP1S3. *Eur. J. Hum. Genet.* **63**, 1197–1210.
8. Díaz-Martínez M., Benito-Jardón L., Alonso L., Koetz-Ploch L., Hernando E., Teixidó J. (2018) miR-204-5p and miR-211-5p contribute to BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Cancer Res*. **78**, 1017–1030.
9. Li S., Kennedy M., Payne S., Kennedy K., Seewaldt V., Pizzo S., Bachelder E. (2014) Model of tumor dormancy/recurrence after short-term chemotherapy. *PLoS One*. **9**(5), e98021.
10. Ravnan M.C., Matalka M.S. (2012) Vemurafenib in patients with BRAF V600E mutation-positive advanced melanoma. *Clin. Ther.* **34**(7), 1474–1486.
11. Кудрявцев И.В., Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнев В.А. (2012) *Проточная цитометрия в экспе-*

- риментальной биологии. Екатеринбург: УрО РАН. 192 с.
12. Shellman M., Shellman Y. (2020) Human against machine? Machine learning identifies microRNA ratios as biomarkers for melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **140**, 18–20.
 13. Tang J., Li Z., Zhu Q., Wen W., Wang J., Xu J., Wu W., Zhu Y., Xu H., Chen L. (2020) miR-204-5p regulates cell proliferation, invasion, and apoptosis by targeting IL-11 in esophageal squamous cell carcinoma. *J. Cell. Physiol.* **235**, 3043–3055.
 14. Hong B.S., Ryu H.S., Kim N., Kim J., Lee E., Moon H., Kim K.H., Jin M.S., Kwon N.H., Kim S., Kim D., Chung D.H., Jeong K., Kim K., Kim K.Y., Lee H.B., Han W., Yun J., Kim J.I., Noh D.Y., Moon H.G. (2019) Tumor suppressor miRNA-204-5p regulates growth, metastasis, and immune microenvironment remodeling in breast cancer. *Cancer Res.* **79**, 1520–1534.
 15. Chung T., Lau T., Cheung T., Yim S., Lo K., Siu N., Chan L., Yu M., Kwong J., Doran G., Barroilhet L., Ng A.S., Wong R., Wang V., Mok S., Smith D., Berkowitz R., Wong Y. (2012) Dysregulation of microRNA-204 mediates migration and invasion of endometrial cancer by regulating FOXC1. *Int. J. Cancer.* **130**, 1036–1045.
 16. Subramani R., Camacho F., Levin C., Flores K., Clift F., Galvez A., Terres M., Rivera S., Kolli S., Dodderer J., Miranda M., Rodriguez A., Pedroza D., Chatterjee A., Lakshmanaswamy R. (2018) FOXC1 plays a crucial role in the growth of pancreatic cancer. *Oncogenesis.* **7**, 52–63.
 17. Myatt S.S., Lam E.W. (2007) The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **7**, 847–859.
 18. Lai E., Prezioso V.R., Smith E., Litvin O., Costa R.H., Darnell J.E. (1990) HNF-3A, a hepatocyte-enriched transcription factor of novel structure is regulated transcriptionally. *Genes Dev.* **4**, 1427–1436.
 19. Wang J., Li L., Liu S., Zhao Y., Wang L., Du G. (2016) FOXC1 promotes melanoma by activating MST1R/PI3K/AKT pathway and is associated with poor prognosis in melanoma. *Oncotarget.* **7**, 375–387.
 20. Omatsu Y., Seike M., Sugiyama T., Kume T., Nagasawa T. (2014) Foxc1 is a critical regulator of haematopoietic stem/progenitor cell niche formation. *Nature.* **508**, 536–540.
 21. Gulyaeva L.F., Kushlinskiy N.E. (2016) Regulatory mechanisms of microRNA expression. *J. Transl. Med.* **14**, 143.
 22. Liu Y., Miao Y., Gao X., Wang Y.Y., Wang H., Zheng Y.W., Zhao Z.Y. (2018) MicroRNA-200a affects the proliferation of airway smooth muscle cells and airway remodeling by targeting FOXC1 via the PI3K/AKT signaling pathway in ovalbumin-induced asthmatic mice. *Cell. Physiol. Biochem.* **50**, 2365–2389.
 23. Zhou Y., Kato H., Asanoma K., Kondo H., Arima T., Kato K., Matsuda T., Wake N. (2002) Identification of FOXC1 as a TGF- β 1 responsive gene and its involvement in negative regulation of cell growth. *Genomics.* **80**, 465–472.
 24. Vitiello M., Tuccoli A., D'Aurizio R., Sarti S., Giannecchini L., Lubrano S., Marranci A., Evangelista M., Peppicelli S., Ippolito C., Barravecchia I., Guzzolino E., Montagnani V., Gowen M., Mercoledi E., Mercatanti A., Comelli L., Gurrieri S., Wu L.W., Ope O., Flaherty K., Boland G.M., Hammond M.R., Kwong L., Chiariello M., Stecca B., Zhang G., Salvetti A., Angeloni D., Pitto L., Calorini L., Chiorino G., Pellegrini M., Herlyn M., Osman I., Poliseno L. (2017) Context-dependent miR-204 and miR-211 affect the biological properties of amelanotic and melanotic melanoma cells. *Oncotarget.* **8**, 25395–25417.

FOXC1-MEDIATED EFFECTS OF miR-204-5p ON MELANOMA CELL PROLIFERATION

**I. Yu. Dubovtseva¹, M. B. Aleksenenko¹, E. D. Nikolaeva¹, A. S. Averchuk¹,
A. V. Moshev³, A. A. Savchenko³, S. V. Markova², and T. G. Ruksha^{1, *}**

¹*Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Krasnoyarsk, 660022 Russia*

²*Institute of Biophysics, Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences", Krasnoyarsk, 660022 Russia*

³*Research Institute for Medical Problems in the North, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, 660022 Russia*

*e-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

MicroRNAs epigenetically regulate gene expression and, therefore, are participating in various physiological and pathological processes. In melanoma cells, miR-204-5p is expressed at very low levels. Previously we showed that the restoration of miR-204-5p expression results in changes in melanoma cells proliferation, migration, and invasion. By bioinformatics analysis, we revealed that miR-204-5p targets mRNA encoding transcriptional factor FOXC1. Luciferase assay showed that miR-204-5p represses FOXC1 expression. Transfection with the siRNA to FOXC1 leads to down-regulation of miR-204-5p, forming a negative feedback between the microRNA and its target gene. Another effect of the FOXC1 siRNA transfection was a decrease in melanoma cell proliferation evident from the results of MTT-test and fluorescent microscopy. The increase of G₀/G₁ positive cells ratio is accomplished with regulation pattern between miR-204-5p and FOXC1 remaining unchanged. Taken together, our findings indicate that miR-204-5p may affect melanoma cell proliferation through its effects on FOXC1.

Keywords: FOXC1, miR-204-5p, melanoma, siRNA, miRNA, quiescent cancer cells