

УДК 616.5-006.81.04:576.08

УГНЕТЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NRF2, ОПОСРЕДОВАННОЕ MIR-155, ВЫЗЫВАЕТ СНИЖЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ ВНЕ ЗАВИСИМОСТИ ОТ РЕДОКС-СТАТУСА

© 2024 г. В. А. Купенко¹, Д. А. Дашкова¹, Т. Г. Рукша^{1,*}

¹Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, 660022, Россия

*E-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

Поступила в редакцию 13.07.2023 г.

После доработки 07.10.2023 г.

Принята 11.10.2023 г.

Ген *NFE2L2* редокс-зависимого транскрипционного фактора NRF2 является мишенью микроРНК miR-155. В представленной работе выполнена трансфекция имитатора (миметика) miR-155 в клетки меланомы В16, устойчивые к дакарбазину. Определено, что под влиянием миметика микроРНК miR-155 в клетках меланомы снижается уровень экспрессии NRF2, кодируемого *NFE2L2*, как в условиях окислительного стресса, так и без него. Снижение уровня NRF2 сопровождалось снижением жизнеспособности устойчивых к дакарбазину клеток меланомы. Таким образом, miR-155-опосредованная активация NRF2, регулирующего выраженность антиоксидантных процессов в клетке, может быть связана с сохранением жизнеспособности и развитием лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Последнее может быть использовано для преодоления химиорезистентности при лечении онкологических заболеваний.

Ключевые слова: меланома, В16, дакарбазин, miR-155, NRF2, ферроптоз, редокс-статус, окислительный стресс

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; ДМСО — диметилсульфоксид; МТТ — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид; ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в реальном времени; PBS — фосфатно-солевой раствор.

DOI: 10.31857/S0041377124010044, **EDN:** IEFCEJ

Активные формы кислорода (АФК) обладают двойственной ролью в канцерогенезе. С одной стороны, они стимулируют разрушение и последующую элиминацию трансформированных клеток, выполняя протективную роль в отношении развития злокачественных новообразований; кроме того, они могут индуцировать развитие клеточного старения и гибель клеток путем ферроптоза (Wu et al., 2019). С другой стороны, при хроническом воспалении АФК, выступая одной из первых линий защиты, обеспечивают окисление макромолекул, приводя к хромосомной нестабильности, появлению мутаций, изменению выраженности процессов пролиферации и дифференцировки (Seddon et al., 2023). В этой связи логично считать, что механизмы, регулирующие антиоксидантные процессы в клетках эукариот, играют существенную роль в канцерогенезе (Cheung, Vousden, 2022).

NRF2 — транскрипционный фактор, функционирование которого связано с поддержанием

редокс-статуса в клетке (Agamouni et al., 2023). Установлено, что NRF2 регулирует экспрессию ряда антиоксидантных молекул, в том числе каталазы, супероксиддисмутазы, глутатиона (Tossetta, Marzioni, 2023). В физиологических условиях NRF2 находится в связанном состоянии с белком Keap1, репрессирующим его активность, и подвергается убиквитин-зависимой деградации в протеасомах.

В условиях действия повреждающих факторов NRF2 высвобождается и транслоцируется в ядро клетки, где образует гетеродимеры с малыми белками Maf и связывается с так называемым антиоксидант-респонсивным элементом (ARE) (Bollong et al., 2018). Генами-мишенями NRF2 являются глутаматцистеинлигаза, тиоредоксинредуктаза 1, NAD(P)H-дегидрогеназа, глутатион-S-трансфераза, гены семейства множественной лекарственной устойчивости. Активация NRF2 приводит к повышению синтеза глутатиона, элиминации АФК,

детоксикации ксенобиотиков, инициации транспорта лекарственных веществ в клетку (Milcovic et al., 2017).

Таким образом, сигнальный путь NRF2/Keap1/ARE относится к ключевым механизмам, активирующимся в условиях нарушенного редокс-статуса (Fan et al., 2017). В нормальных клетках посредством NRF2/Keap1/ARE происходит усиление транскрипции генов провоспалительных и антиоксидантных факторов, что снижает вероятность нестабильности генома (Самиña, Penning, 2022).

Усиление активности NRF2 в опухолевых клетках может быть связано с приобретением последними повышенной устойчивости к повреждающим факторам, в том числе к противоопухолевым лекарственным средствам. Пока нет однозначного ответа, носит ли функционирование NRF2 в опухолевых клетках про- или, напротив, антиканцерогенный характер. Описаны попытки целенаправленного воздействия на NRF2 с терапевтической целью при злокачественных новообразованиях, хотя весьма широкий спектр функций NRF2 являлся фактором, ограничивающим эту область исследований (Feng et al., 2023).

Выявлено, что длинная некодирующая РНК LINC00239 вызывает нестабильность комплекса NRF2/Keap1, приводя к NRF2-опосредованному усилению пролиферации и ингибированию ферроптоза клеток колоректального рака (Han et al., 2022). Вместе с тем для развития колоректального рака *in vivo* одной активации или ингибирования только NRF2 было недостаточно (Knatko et al., 2021).

Ряд микроРНК описан в качестве регуляторов экспрессии гена *NFE2L2*, кодирующего транскрипционный фактор NRF2. *NFE2L2* является геном-мишенью микроРНК miR-155 (Aksenenko et al., 2019; Liu et al., 2023). Обычно функционирование miR-155 в клетках меланомы рассматривается как оносупрессорное. Эктопическая экспрессия miR-155 вызывала снижение миграции и инвазии клеток меланомы (Li et al., 2019). Повышение miR-155 посредством трансфекции в клетки меланомы миметика miR-155 приводило к ингибированию метастазирования *in vivo*, что было опосредовано снижением уровня мишеневого гена — протеинкиназы WEE1, являющейся компонентом сигнального пути BRAF. Помимо уменьшения интенсивности метастазирования, при трансфекции в клетки меланомы миметика miR-155, происходило снижение их жизнеспособности (DiSano et al., 2019).

В этой связи целью данного исследования являлось определение эффекта трансфекции миметика микроРНК miR-155 на уровень мРНК гена *NFE2L2* и жизнеспособности клеток меланомы, резистентных к дакарбазину, в условиях окислительного стресса.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные линии и условия культивирования. В эксперименте использовали клеточную линию меланомы В16, любезно предоставленную НИИ фундаментальной и клинической иммунологии (Новосибирск, Россия).

Клетки культивировали в среде DMEM (“Пан-Эко”; Москва, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (HyClone, GmbH, Parsching, Австрия), 1% антибиотика/антимикотика (Gibco Life Technologies; Гранд-Айленд, США). Клетки культивировали в инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ (Sanyo MSO-5AC, Осака, Япония).

Воздействие цитостатическим препаратом дакарбазин. Клетки меланомы В16 в концентрации 1·10⁵ кл./мл обрабатывали 1.2 мМ раствором дакарбазина (Sigma-Aldrich, США), разведенного в ДМСО, и культивировали в течение 72 ч при 37 °С. Затем клетки промывали стерильным фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и культивировали дополнительно в питательной среде DMEM без дакарбазина в течение 48 ч, как было нами описано ранее (Esimbekova et al., 2023). В качестве контроля использовали исходные культуры клеток, обработанные 0.1% ДМСО.

МТТ-тест. Для оценки метаболической активности (жизнеспособности) клеток после воздействия миметиком микроРНК miR-155 выполняли МТТ-тест. Питательную среду отбирали из лунок, заменяли ее на свежую полную среду с МТТ (5 мг МТТ на 1 мл полной питательной среды) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Нидерланды). В каждую лунку добавляли по 135 мкл полной питательной среды и по 15 мкл концентрата МТТ. Далее клетки культивировали в условиях CO₂-инкубатора в течение 4 ч. Затем отбирали жидкость из лунок, добавляли 200 мкл ДМСО и культивировали еще 10 мин. Оптическую плотность раствора в лунках определяли на спектрофотометре “Эфос-9305” (“Фотосистемы Швабе”, Россия) при длине волны 594 нм.

Трансфекция миметика микроРНК miR-155 в клетки меланомы В16. Трансфекцию миметика

микроРНК miR-155 в клетки меланомы линий B16 осуществляли после воздействия цитостатическим препаратом дакарбазином в бессывороточной питательной среде. Для увеличения количества микроРНК miR-155 в клетках меланомы использовали коммерческий миметик микроРНК mmu-miR-155 mirVana™ miRNA mimics (№ 4464066; Invitrogen, США) и для отрицательного контроля — mirVana™ miRNA Mimic Negative Control 1 (№ 4464058; Invitrogen, США) в комплексе с реагентом для трансфекции Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (Invitrogen, США).

В соответствии с прилагаемым протоколом производителя на 2 мл клеточной суспензии в концентрации $4 \cdot 10^4$ кл./мл использовали 12 мкл раствора миметика miR-155 или отрицательного контроля миметика и 6 мкл трансфектанта. После приготовления растворов Lipofectamine™ 3000 и миметика (негативного контроля), их смешивали и инкубировали 15 мин для проникновения миметика в липосферы. Конечная концентрация вводимых миметика микроРНК и отрицательного контроля в питательной среде составляла 250 нМоль/л. Трансфекцию осуществляли в течение 48 ч при температуре 37 °С и содержании углекислого газа 5% в условиях CO₂-инкубатора.

Индукция окислительного стресса. Стресс вызывали добавлением в лунки планшета с клетками раствора перекиси водорода (H₂O₂) в конечной концентрации 700 мкМ, как нами было описано ранее (Komina et al., 2012). Клетки предварительно обрабатывали дакарбазином в отдельной серии экспериментов с последующей трансфекцией негативного контроля к микроРНК miR-155 или миметика miR-155. После добавления H₂O₂ в лунки планшета клетки культивировали в условиях CO₂-инкубатора в течение 60 мин. Затем среду с H₂O₂ заменяли на среду без H₂O₂ и оставляли клетки на 24 ч в условиях CO₂-инкубатора.

Выделение РНК и реакция обратной транскрипции. Выделение РНК из культуры клеток проводили с помощью набора реагентов diaGene (№ 3317; “Диаэм”, Россия) согласно протоколу производителя. Выделение тотальной РНК из клеток культур осуществляли после двукратной отмывки клеток от питательной среды стерильным PBS и дальнейшего лизиса клеток лизирующим раствором, входящим в состав набора. Полученные РНК-элюаты объемом 40 мкл использовали сразу для исследований, или сохраняли при температуре –70 °С.

Для синтеза первой цепи кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора

MMLV RT kit (№ SK021; “Евроген”, Россия) согласно протоколу производителя. Каждый образец состоял из 3 мкл раствора полученной РНК и 1.5 мкл случайного декануклеотидного праймера или 5-кратного раствора специфических праймеров из соответствующего набора для исследования экспрессии микроРНК/мРНК и 5.5 мкл реакционной смеси, состоящей из 1 мкл смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP), 1 мкл 1.4-дителиотреитола (ДТТ), 2 мкл 5-кратного раствора реакционного буфера, 0.5 мкл обратной транскриптазы MMLV и 1 мкл безнуклеазной воды. Образец инкубировали в термостате при 37 °С в течение 50 мин, а затем реакцию останавливали, нагревая образцы в течение 10 мин при 70 °С.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени. ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) выполняли на амплификаторе StepOne™ (Applied Biosystems, Сингапур) с протоколом термоциклирования: 1 цикл 50 °С — 2 мин, 95 °С — 10 мин, затем 40 циклов 95 °С — 15 с, 60 °С — 1 мин. Реакционная смесь для каждой реакции амплификации в общем объеме 20 мкл состояла из 2 мкл кДНК, 1 мкл исследуемых праймеров, 8 мкл 2.5-кратной реакционной смеси для ПЦР в присутствии ROX (Синтол, Россия), 1.2 мкл раствора MgCl₂ и 6.8 мкл безнуклеазной воды.

Для определения экспрессии мРНК использовали набор для оценки уровня NRF2 (Mm00477784_m1; Applied Biosystems, США), для нормализации образцов в качестве эндогенных контролей определяли уровни мРНК HPRT1 (Mm00446968_m1; Applied Biosystems, США) и GAPDH (Mm99999915_g1; Applied Biosystems, США).

Используемые реагенты для определения экспрессии микроРНК: набор для детекции экспрессии микроРНК miR-155 (mmu-miR-204 PN4427975 002571; Applied Biosystems, США). В качестве эндогенных контролей использовали U6 snRNA (NR_004394 001973; Applied Biosystems, США) и snoRNA234 (AF357329 001234; Applied Biosystems, США).

Данные анализировали количественно с определением относительных уровней экспрессии исследуемых молекул при помощи метода ΔΔСТ (Livak, Schmittgen, 2001). Для этого относительные уровни экспрессии микроРНК и мРНК по каждому эндогенному контролю рассчитывали по формуле $2^{-\Delta\Delta CT}$, где СТ — средние пороговые циклы образцов, при которых кривая флуоресценции ROX пересекала заданную линию фона, а ΔСТ

определяли разницей СТ исследуемого маркера и СТ эндогенного нормирующего контроля для данного маркера.

Кроме нормализации по эндогенному контролю осуществляли нормализацию по эталонному образцу. $\Delta\Delta$ СТ — разница Δ СТ образца после воздействия и Δ СТ интактного образца без какого-либо воздействия. Для каждой исследуемой пробы методом ПЦР-РВ выполняли два технологических повтора.

Статистическая обработка. Все эксперименты по клеточному культивированию проводили в трех повторностях. Полученные результаты представлены в виде среднего значения из трех повторов и его стандартной ошибки. Различия считали как статистически значимыми при $P < 0.05$. Достоверность различий оценивали на основе критерия Краскелла–Уоллеса с дальнейшим сравнением попарно с помощью критерия Манна–Уитни с помощью программного обеспечения Statistica 7.0 (StatSoft, Россия). Статистические результаты получены с использованием GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В клетках меланомы В16, подвергнутых действию дакарбазина с последующей трансфекцией миметика микроРНК miR-155 наблюдали повышение уровня miR-155 по сравнению с клетками, подвергнутыми действию ДМСО ($P = 0.0495$), дакарбазина ($P = 0.0495$), дакарбазина с последующей трансфекцией негативного контроля ($P = 0.0495$) (рис. 1).

В клетках меланомы В16 на фоне гиперэкспрессии микроРНК miR-155 было обнаружено снижение уровня мРНК *NFE2L2* по сравнению с клетками, подвергнутыми действию ДМСО, дакарбазина и дакарбазина с последующей трансфекцией негативного контроля (во всех случаях $P = 0.0495$). Помимо этого, уровень экспрессии *NFE2L2* снижался в клетках меланомы В16 после действия дакарбазина по сравнению с клетками, подвергнутыми воздействию ДМСО ($P = 0.0495$) (рис. 2а).

При добавлении в культуральную среду H_2O_2 для индукции окислительного стресса через 24 ч после отмывки уровень экспрессии *NFE2L2* снижался в клетках, подвергнутых действию дакарбазина с последующей трансфекцией миметика miR-155 по сравнению со всеми тремя контрольными группами — клетками с добавлением ДМСО, дакарбазина и дакарбазина в сочетании с негатив-

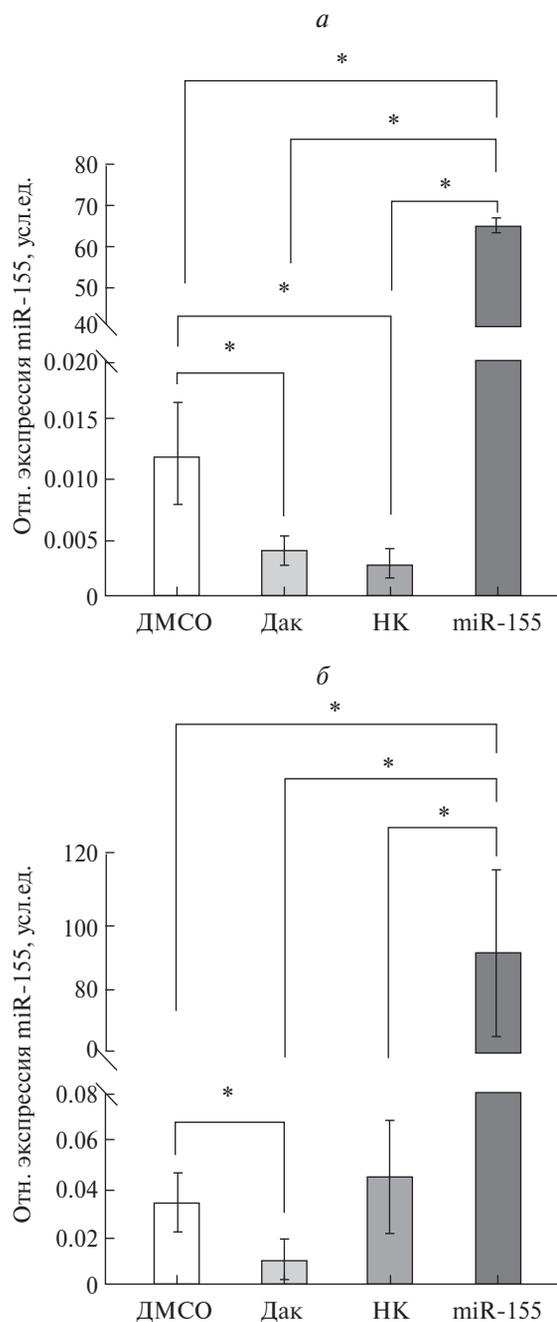


Рис. 1. Уровни экспрессии микроРНК miR-155 в клетках меланомы В16 после действия 0.1% ДМСО, 1.2 мМ дакарбазина, дакарбазина с последующей трансфекцией негативного имитатора miR-155, дакарбазина с последующей трансфекцией миметика микроРНК miR-155 до окислительного стресса (а) и через 24 ч после добавления 700 мкМ H_2O_2 (б). По результатам ПЦР-РВ; (*) — различия достоверны при $P = 0.0495$ (критерий Краскелла–Уоллеса).

ным контролем (во всех случаях $P = 0.0495$) (см. рис. 2б).

Стоит отметить, что уровень экспрессии *NFE2L2* после действия дакарбазина снижался

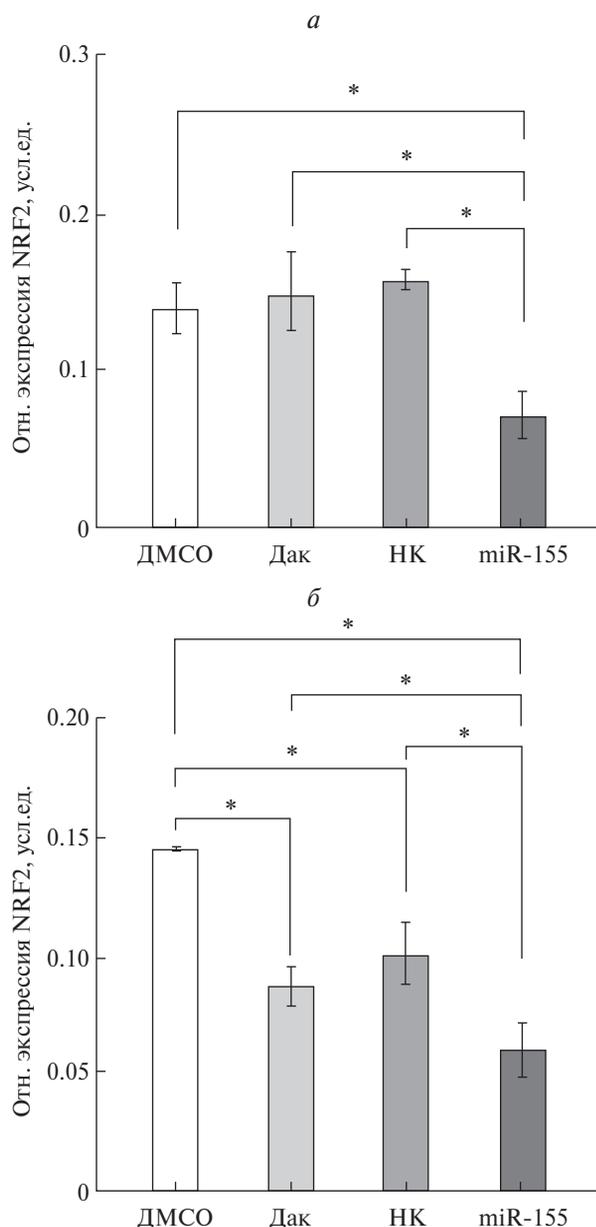


Рис. 2. Уровни экспрессии *NFE2L2*, кодирующего транскрипционный фактор NRF2, в клетках меланомы В16, подвергнутых воздействию ДМСО, дакарбазина, дакарбазина с последующей трансфекцией негативного контроля, дакарбазина с последующей трансфекцией миметика микроРНК miR-155 в отсутствие H₂O₂ (а) и после добавления 700 мкМ H₂O₂ (б). (*) — $P=0.0495$ (критерий Краскелла–Уоллеса).

при индукции в клетках окислительного стресса, а дополнительная трансфекция миметика miR-155 не оказывала влияния на уровни экспрессии гена транскрипционного фактора NRF2 (см. рис. 2).

При оценке жизнеспособности клеток меланомы В16 вне зависимости от редокс-статуса, трансфекция миметика микроРНК вызывала снижение жизнеспособности клеток ($P=0.0495$). По-

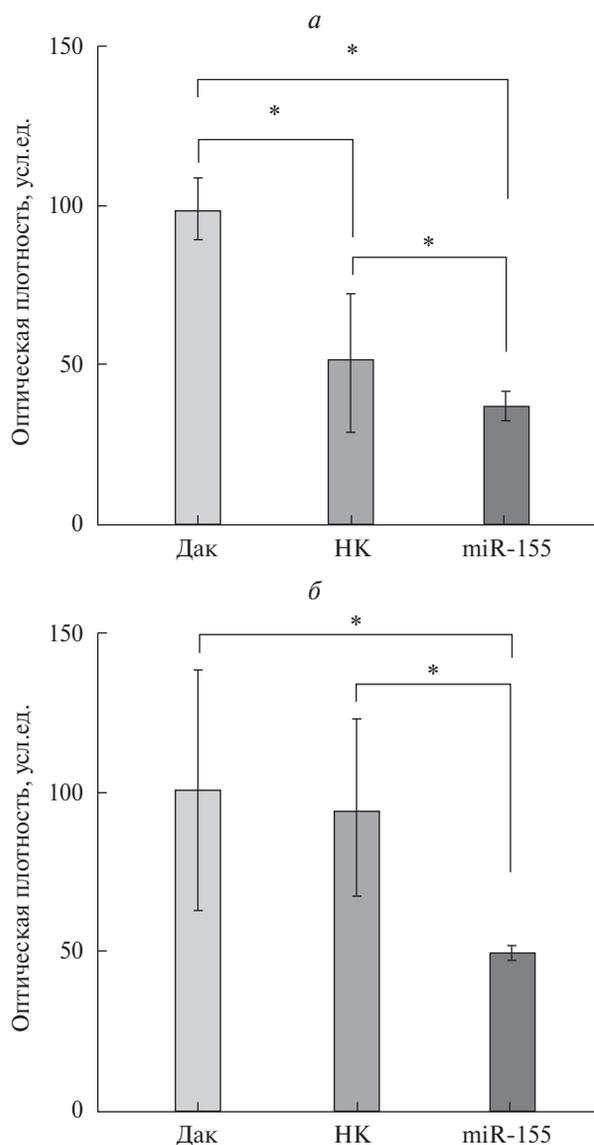


Рис. 3. Жизнеспособность клеток меланомы В16, подвергнутых воздействию ДМСО, дакарбазина, дакарбазина с последующей трансфекцией негативного контроля, дакарбазина с последующей трансфекцией миметика микроРНК miR-155 в отсутствие H₂O₂ (а) и после добавления 700 мкМ H₂O₂ (б). Оценка оптической плотности продукта реакции в МТТ-тесте. (*) — $P=0.0495$ (критерий Краскелла–Уоллеса).

мимо этого, в условиях отсутствия окислительного стресса трансфекция негативного контроля также вызывала уменьшение жизнеспособности клеток ($P=0.0495$). Этот эффект нивелировался индукцией окислительного стресса (рис. 3).

Визуально морфология клеток меланомы В16 изменялась после действия дакарбазина: клетки приобретали веретенообразную форму (рис. 4б, 4е), что может быть связано с транскриптомным перепрограммированием под действием дакарбазина и последующим изменением процессов меж-

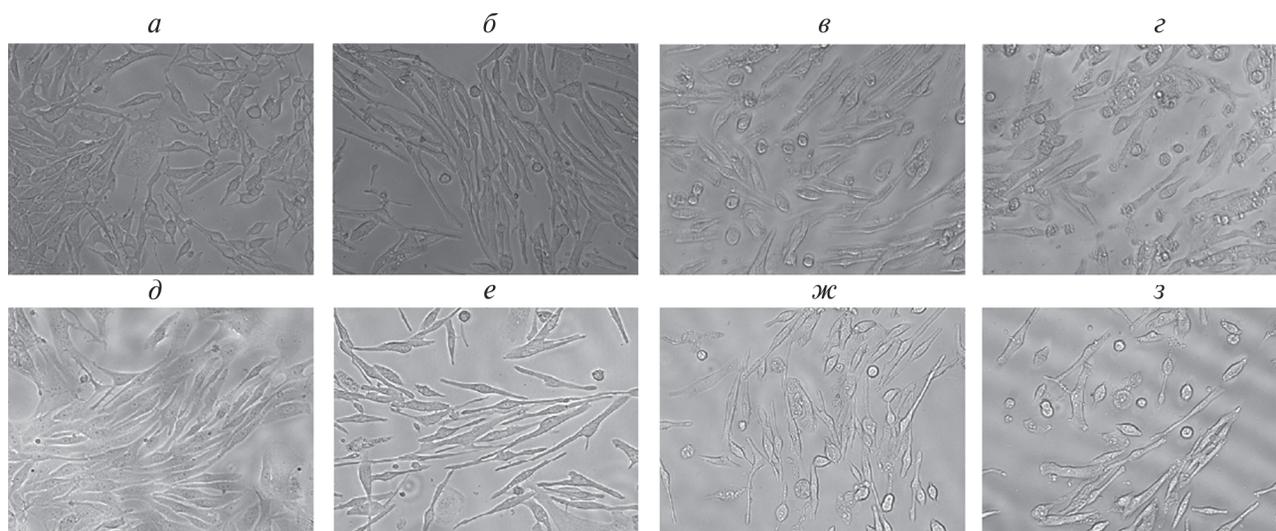


Рис. 4. Культура клеток меланомы линии V16 после воздействия ДМСО (а), дакарбазина (б), дакарбазина с последующей трансфекцией негативного контроля (в), дакарбазина с последующей трансфекцией миметика микроРНК miR-155 (г) в условиях отсутствия (а–г) и после добавления 700 мкМ H_2O_2 в тех же группах (д–ж).

клеточной коммуникации (Esimbekova et al., 2023). Трансфекция антисмысловых олигонуклеотидов в дальнейшем не влияла на морфологию клеток (рис. 4в–г, 4ж–з).

ОБСУЖДЕНИЕ

Терапия злокачественных новообразований остается малоэффективной в отношении диссеминированных форм опухолей, что поддерживает актуальность исследования молекулярных механизмов их лекарственной устойчивости, поиска новых стратегий противоопухолевого воздействия.

Дакарбазин является химиотерапевтическим агентом, используемым в качестве базового средства для лечения меланомы кожи. Он представляет собой алкилирующий агент, индуцирующий повреждение ДНК и, как предполагалось, последующую остановку клеточного цикла с развитием апоптоза. К сожалению, эффективность дакарбазина незначительна, а механизмы низкой эффективности до сих пор остаются недостаточно понятными.

Вместе с тем известно, что химиотерапевтические средства индуцируют в опухолевых клетках окислительный стресс (Wang et al., 2021), что должно снижать их жизнеспособность. Безусловно, антиоксидантные системы клеток в таких условиях, выполняя цитопротекторную роль, способствуют выживаемости опухолевых клеток.

Целью представленной работы было miR-155-опосредованное снижение экспрессии редокс-чувствительного транскрипционного фактора NRF2 в клетках меланомы в условиях окислительного

стресса для оценки возможного антиканцерогенного действия miR-155.

Для этого в клетки меланомы, подвергнутые действию дакарбазина и сохранившие жизнеспособность (Esimbekova et al., 2023), трансфицировали миметик микроРНК miR-155. В дальнейшем клетки подвергали действию перекиси водорода, как было описано нами ранее (Komina et al., 2012), с последующим определением уровня miR-155, ее гена-мишени *NFE2L2*, кодирующего транскрипционный фактор NRF2, и оценкой жизнеспособности клеток.

Оверэкспрессию микроРНК miR-155 осуществляли в клетках меланомы посредством трансфекции миметика на основе олигонуклеотидов. Эффективность трансфекции оценивали по уровню miR-155. Только в клетках с трансфицированным миметиком miR-155 наблюдали повышение ее уровня, что говорит об успешной трансфекции олигонуклеотидов.

Помимо этого, в клетках с трансфицированным имитатором miR-155 отмечали снижение уровня ее гена-мишени *NFE2L2*. Это косвенно еще раз указывает на эффективность оверэкспрессии miR-155, подтверждает, что NRF2 является функциональной мишенью miR-155. Стоит отметить, что в клетках, подвергнутых воздействию только дакарбазином, уровень *NFE2L2* также снижался, хотя и не столь значительно. Данный факт может быть свидетельством способности дакарбазина модулировать уровни экспрессии *NFE2L2*.

Понижение уровня NRF2 в клетках с трансфицированным миметиком miR-155 соответствовало снижению жизнеспособности клеток меланомы.

Стоит отметить, что в данном случае трансфекцию миметика miR-155 осуществляли в клетки меланомы, сохранившие жизнеспособность после воздействия дакарбазином.

Как следует из наших предыдущих исследований, доля таких клеток составляла 50% (Lapkina et al., 2023). По всей видимости, miR-155-опосредованное снижение уровня NRF2 вызывает угнетение жизнеспособности дакарбазин-резистентных клеток меланомы.

Стоит отметить, что повышение уровня NRF2 при этом не происходило в условиях индукции окислительного стресса. Последнее также может указывать на выраженное супрессивное действие miR-155 в отношении NRF2.

Таким образом, в клетках меланомы NRF2 является функциональной мишенью микроРНК miR-155. miR-155, действуя каноническим путем, вероятнее всего, связывается с мРНК NRF2 в комплементарном участке 3'-нетранслируемой области, приводя к деградации последней, что и вызывает снижение соответствующего уровня экспрессии.

Сочетанное применение дакарбазина с миметиком miR-155 может вызывать NRF2-опосредованное снижение жизнеспособности клеток меланомы. Последнее может быть применено для преодоления лекарственной устойчивости опухолевых клеток, обусловленной повышением активности в них антиоксидантных систем.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-15-00110; <https://rscf.ru/project/19-15-00110/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Лапкина Е.З., Есимбекова А.Р., Белениук В.Д., Савченко А.А., Рукша Т.Г. 2022. Распределение клеток меланомы В16 по фазам клеточного цикла под воздействием дакарбазина. Цитология. Т. 64. № 6.

- С. 573. (Lapkina E.Z., Esimbekova A.R., Beleniuk V.D., Savchenko A.A., Ruksha T.G. 2023. The distribution of B16 melanoma cells in cell-cycle phases under the influence of dacarbazine. *Cell Tiss. Biol.* V. 17. P. 161.)
- Aksenenko M.B., Palkina N.V., Sergeeva O.N., Sergeeva Yu.E., Kirichenko A.K., Ruksha T.G. 2019. miR-155 overexpression is followed by downregulation of its target gene, *NFE2L2*, and altered pattern of VEGFA expression in the liver of melanoma B16-bearing mice at the premetastatic stage. *Int. J. Exp. Pathol.* V. 100. P. 311.
- Aramouni K., Assaf R., Shaito A., Fardoun M., Al-Asmakh M., Sahebkar A., Eid A.H. 2023. Biochemical and cellular basis of oxidative stress: Implications for disease onset. *J. Cell Physiol.* V. 238. P. 1951. <https://doi.org/10.1002/jcp.31071>
- Bollong M.J., Lee G., Coukos J.S., Yun H., Zambaldo C., Chang J.W., Chin E.N., Ahmad I., Chatterjee A.K., Lairson L.L., Schultz P.G., Moellering R.E. 2018. A metabolite-derived protein modification integrates glycolysis with KEAP1-NRF2 signalling. *Nature.* V. 562. P. 600. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0622-0>
- Camiña N., Penning T.M. 2022. Genetic and epigenetic regulation of the NRF2-KEAP1 pathway in human lung cancer. *Br. J. Cancer.* V. 126. P. 1244. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01642-0>
- Cheung E.C., Vousden K.H. 2022. The role of ROS in tumour development and progression. *Nat. Rev. Cancer.* V. 22. P. 280. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00435-0>
- DiSano J.A., Huffnagle I., Gowda R., Spiegelman V.S., Robertson G.P., Pameijer C.R. 2019. Loss of miR-155 upregulates WEE1 in metastatic melanoma. *Melanoma Res.* V. 29. P. 216. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000545>
- Esimbekova A.R., Palkina N.V., Zinchenko I.S., Belenyuk V.D., Savchenko A.A., Sergeeva E.Y., Ruksha T.G. 2023. Focal adhesion alterations in G0-positive melanoma cells. *Cancer Med.* V. 12. P. 7294. <https://doi.org/10.1002/cam4.5510>
- Fan Z., Wirth A.K., Chen D., Wruck C.J., Rauh M., Buchfelder M., Savaskan N. 2017. Nrf2-Keap1 pathway promotes cell proliferation and diminishes ferroptosis. *Oncogenesis.* V. 6. P. 371. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.65>
- Feng Q., Xu X., Zhang S. 2023. Nrf2 protein in melanoma progression, as a new means of treatment. *Pigment Cell Melanoma Res.* <https://doi.org/10.1111/pcmr.13137>
- Han Y., Gao X., Wu N., Jin Y., Zhou H., Wang W., Liu H., Chu Y., Cao J., Jiang M., Yang S., Shi Y., Xie X., Chen F., Han Y., et al., 2022. Long noncoding RNA LINC00239 inhibits ferroptosis in colorectal cancer by binding to Keap1 to stabilize Nrf2. *Cell Death Dis.* V. 13. P. 742. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05192-y>
- Knatko E.V., Castro C., Higgins M., Zhang Y., Honda T., Henderson C.J., Wolf C.R., Griffin J.L., Dinkova-Kostova A.T. 2021. Nrf2 activation does not affect adenoma development in a mouse model of colorectal cancer. *Commun. Biol.* V. 4. P. 1081. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02552-w>
- Komina A.V., Korostileva K.A., Gyrylova S.N., Belonogov R.N., Ruksha T.G. 2012. Interaction between single nucleotide polymorphism in catalase gene and catalase activity under

- the conditions of oxidative stress. *Physiol. Res.* V. 61. P. 655. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932333>
- Li H., Song J.B., Chen H.X., Wang Q.Q., Meng L.X., Li Y.* 2019. MiR-155 inhibits proliferation, invasion and migration of melanoma via targeting CBL. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* V. 23. P. 9525. https://doi.org/10.26355/eurev_201911_19447
- Liu G., He L., Yang X., Tang L., Shi W., She J., Wei J.* 2023. MicroRNA-155-5p aggravates adriamycin-induced focal segmental glomerulosclerosis through targeting Nrf2. *Nephron.* V. 147. P. 108. <https://doi.org/10.1159/000525233>
- Milkovic L., Zarkovic N., Saso L.* 2017. Controversy about pharmacological modulation of Nrf2 for cancer therapy. *Redox Biol.* V. 12. P. 727. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.013>
- Seddon A.R., Das A.B., Hampton M.B., Stevens A.J.* Site-specific decreases in DNA methylation in replicating cells following exposure to oxidative stress. *Hum. Mol. Genet.* 2023. V. 32. P. 632. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddac232>
- Tossetta G., Marzoni D.* 2023. Targeting the NRF2/KEAP1 pathway in cervical and endometrial cancers. *Eur. J. Pharmacol.* V. 941. P. 175503. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175503>
- Wang J., Sun Y., Zhang X., Cai H., Zhang C., Qu H., Liu L., Zhang M., Fu J., Zhang J., Wang J., Zhang G.* 2021. Oxidative stress activates NORAD expression by H3K27ac and promotes oxaliplatin resistance in gastric cancer by enhancing autophagy flux via targeting the miR-433-3p. *Cell Death Dis.* V. 12. P. 90. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03368-y>
- Wu J., Minikes A.M., Gao M., Bian H., Li Y., Stockwell B.R., Chen Z.N., Jiang X.* 2019. Intercellular interaction dictates cancer cell ferroptosis via NF2-YAP signalling. 2019. *Nature.* V. 572. P. 402. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1426-6>

INHIBITION OF NRF2 TRANSCRIPTION FACTOR MEDIATED BY MIR-155 DIMINISHES MELANOMA CELL VIABILITY INDEPENDENTLY OF REDOX STATUS

V.A. Kutsenko^a, D.A. Dashkova^a, T.G. Ruksha^a

^a Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, 660022, Russia

* E-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

Redox-sensitive NRF2 transcription factor is a target gene of microRNA miR-155. miR-155 mimic was transfected in dacarbazine-resistant melanoma cells. NRF2 expression levels were down-regulated in miR-155-overexpressed cells independently of oxidative stress induced by hydrogen peroxide. NRF2 suppression was associated with a decrease of melanoma cells viability. As a result, miR-155-mediated NRF2 overexpression that regulate intensity of a cell antioxidant processes can be associated with cancer cell survival leading to drug resistance. NRF2 repression by miR-155 highlighted a potential for NRF2 down-regulation as an approach in anticancer therapy.

Keywords: melanoma, B16, dacarbazine, miR-155, *NFE2L2*, ferroptosis, redox-status, oxidative stress