

УДК 576.32/.36:576.385.5

DOI: 10.7868/S3034606126010032

РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА Zeb1 В РЕПАРАЦИИ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А. А. Попович, А. А. Дакс, О. Ю. Шувалов, О. А. Фёдорова, А. П. Родимцев,
Е. Н. Толкунова, С. Е. Парфеньев*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Российская Федерация

** E-mail: gen21eration@gmail.com*

Аннотация. Обоснование и цель. Транскрипционный фактор Zeb1 является ключевым регулятором эпителиально-мезенхимного перехода — процесса, лежащего в основе метастазирования опухолей, также способствует развитию резистентности к химиотерапии, возможно, посредством регуляции репарации двунитевых разрывов ДНК. В работе оценивали влияние Zeb1 на ключевые факторы основных путей репарации двунитевых повреждений ДНК: гомологичной рекомбинации (HR) и негомологичного соединения концов (NHEJ). **Материалы и методы.** Эксперименты проводили на линиях клеток MCF7 рака молочной железы люминального подтипа А и тройного негативного подтипа MDA-MB-231. Оценивали влияние Zeb1 на ключевые медиаторы репарации HR и NHEJ (с помощью Вестерн-блоттинга и ПЦР в реальном времени) жизнеспособность клеток (по МТТ-тесту, апоптоз — по окрашиванию (аннексин V–FITC/7–AAD). **Результаты.** В люминальных клетках MCF7 фактор Zeb1 подавляет ключевые компоненты пути HR: BRCA1, BRCA2, RAD51, и активирует DNA-ПК, ключевой фермент пути NHEJ. В условиях генотоксического стресса это приводит к значительному повышению выживаемости клеток за счет подавления апоптоза. Напротив, в трижды негативных клетках рака молочной железы MDA-MB-231 фактор Zeb1 повышает экспрессию компонентов путей репарации как HR, так и NHEJ (DNA-ПК, Ku70, XRCC4). **Заключение.** В люминальных клетках рака молочной железы Zeb1 повышает выживаемость за счет подавления HR и активации NHEJ, тогда как в трижды негативных клетках рака молочной железы он повышает активность обоих путей репарации. Эти данные демонстрируют, что влияние Zeb1 на репарацию ДНК и резистентность к терапии зависит от клеточного контекста, определяемого подтипом опухоли.

Ключевые слова: Zeb1, репарация ДНК, HR, NHEJ, рак молочной железы

Принятые сокращения: РМЖ — рак молочной железы, ПЦР — полимеразная цепная реакция, DOX — доксорубин, ER — рецептор эстрогена, ETO — этопозид; HER2 — рецептор эпидермального фактора роста человека, HR — гомологичная рекомбинация, NHEJ — негомологичное соединение концов, PR — рецептор прогестерона.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 24-25-00161).

Соблюдение этических стандартов. Авторы работы не проводили экспериментов с участием животных или людей.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Ссылка для цитирования: Попович А. А., Дакс А. А., Шувалов О. Ю., Фёдорова О. А., Родимцев А. П., Толкунова Е. Н., Парфеньев С. Е. Регуляторная роль транскрипционного фактора Zeb1 в репарации двунитевых разрывов ДНК в клетках рака молочной железы. Цитология / Cell and Tissue Biology, 2026, том 68, № 1, с. 38. doi: 10.7868/S3034606126010032

Поступила в редакцию 05.11.2025
После доработки 22.11.2025
Принята к публикации 23.11.2025

DOI: 10.7868/S3034606126010032

Regulatory Role of the Transcription Factor Zeb1 in DNA Double-Strand Break Repair in Breast Cancer

A. A. Popovich, A. A. Daks, O. Yu. Shuvalov, O. A. Fedorova, A. P. Rodimtsev,
E. N., Tolkunova, S. E. Parfenyev*

Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, 194064, Russian Federation

* *E-mail: gen21eration@gmail.com*

Abstract. Objective: Transcription factor Zeb1, known for its role in metastasis, also contributes to chemotherapy resistance, possibly through the regulation of DNA double-strand break repair. This study investigates how Zeb1 affects key factors in the major DNA double-strand break repair pathways: homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ). **Materials and methods:** Experiments were performed on MCF7 (luminal subtype) and MDA-MB-231 (triple-negative subtype) breast cancer cell lines. Western blot analysis and real-time PCR were used to demonstrate the effect of Zeb1 on the key mediators in HR and NHEJ repair. Cell viability was also assessed using the MTT assay, and apoptosis was quantified by AnnexinV–FITC/7-AAD staining. **Results:** In luminal MCF7 cells, Zeb1 suppresses key components of the HR pathway: BRCA1, BRCA2, RAD51, and activates DNA-PK, a key enzyme in the NHEJ pathway. Under conditions of genotoxic stress, this leads to a significant increase in cell survival by suppressing apoptosis. Conversely, in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells, Zeb1 upregulates the expression of components in both HR and NHEJ repair pathways (DNA-PK, Ku70, XRCC4). **Conclusion:** In luminal breast cancer cells, Zeb1 enhances survival by suppressing HR and activating NHEJ, while in triple-negative breast cancer cells, it upregulates both repair pathways. These data demonstrate that the effects of Zeb1 on DNA repair and resistance to therapy depend on the cellular context determined by the tumor subtype.

Keywords: epithelial-mesenchymal transition, Zeb1, DNA repair, breast cancer, HR, NHEJ, MCF7, MDA-MB-231

Funding. This work was supported by the Russian Scientific Foundation (project ID: 24-25-00161).

Ethics approval and consent to participate. This work does not contain any studies involving human and animal subjects.

Conflict of interest. The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

For citation: Popovich A. A., Daks A. A., Shuvalov O. Yu., Fedorova O. A., Rodimtsev A. P., Tolkunova E. N., Parfenyev S. E. Regulatory role of the transcription factor Zeb1 in DNA double-strand break repair in breast cancer. *Tsitologiya / Cell and Tissue Biology*, 2025, vol. 68, no. 1, p. 38. doi: 10.7868/S3034606126010032

Received November 05, 2025

Revised November 22, 2025

Accepted November 23, 2025

Транскрипционный фактор *Zeb1* широко известен как один из основных регуляторов процесса эпителиально-мезенхимного перехода, являющегося основной метастазирования. Однако этот транскрипционный фактор также принимает участие в ряде других важных клеточных процессов. В частности, *Zeb1* поддерживает пластичность хроматина — его способность изменять структуру в ответ на различные стимулы, что позволяет регулировать репарацию ДНК в ответ на ее повреждение (Moyret-Lalle et al., 2022). Наибольшую угрозу в контексте опухолевой трансформации представляют двунитевые разрывы ДНК, поскольку они являются основной причиной геномной нестабильности и напрямую связаны с онкогенезом (Moyret-Lalle et al., 2022). При этом контролируемая индукция образования двунитевых разрывов ДНК лежит в основе действия большого числа генотоксических противоопухолевых препаратов. Такие препараты индуцируют повреждения ДНК в опухолевых клетках, что приводит к их гибели.

Рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место среди онкологических заболеваний у женщин как в России, так и в мире. Доксорубин (DOX) часто используется в химиотерапии РМЖ отдельно или в сочетании с другими препаратами и считается наиболее эффективным и распространенным противоопухолевым химиотерапевтическим препаратом (Wang et al., 2021; Schreiber et al., 2025). Другой генотоксический препарат эпозид (ЕТО) успешно применяют в комбинированной химиотерапии при РМЖ (Cao et al., 2023; Chen et al., 2025). DOX и ЕТО ингибируют ДНК-топоизомеразу II — фермент, критически важный для разделения и воссоединения цепей ДНК во время репликации. Однако опухолевые клетки часто развивают устойчивость к терапии с использованием генотоксических препаратов, и ключевую роль в этом процессе играет белок *Zeb1* (Zhang et al., 2015). Показано, что *Zeb1* вызывает резистентность клеток гепатоцеллюлярной карциномы (Long et al., 2019) и РМЖ (Lu et al., 2022) к действию DOX, а также делает клетки РМЖ менее чувствительными к ЕТО (Schwab et al., 2024).

Двунитевые разрывы ДНК появляются в результате физического или химического воздействия, а также при нарушениях в процессе репликации ДНК (Gartner, Engebrecht, 2022). Как правило, подобные повреждения ДНК могут быть восстановлены с помощью гомологичной рекомбинации (HR) или негомологичного соединения концов (non-homologous end-joining, NHEJ). В большинстве соматических клеток NHEJ является основным путем репарации, который позволяет осуществлять прямое лигирование поврежденных концов ДНК (Chang et al., 2017), что приводит к ошибкам при восстановлении нуклеотидной последовательности ДНК (Mourrain, Boissonneault, 2021). HR, напротив, восстанавливает двунитевые разрывы без потери генетической информации, используя для этого гомологичный участок неповрежденной сестринской молекулы ДНК, однако действие HR ограничено фазами

клеточного цикла и используется клеткой в фазах S и G₂ и преобладает во время мейоза, а в фазе G₁ основную нагрузку берет на себя NHEJ (Gartner, Engebrecht, 2022).

Ключевыми участниками основных этапов NHEJ являются белки Ku70 и Ku80, ДНК-зависимая протеинкиназа DNA-PK и белок репарации ДНК XRCC4. Ku70 образует гетеродимер с Ku80, а затем, связываясь с поврежденными концами ДНК, создает затравку для присоединения других участников репарации, включая белок XRCC4 (Nemoz et al., 2018). Последний, взаимодействуя с вспомогательным белком XLF, способствует совмещению концов ДНК, образованных в ходе ее разрыва, и обеспечивает работу ДНК-лигазы IV, направленную на лигирование концевых участков ДНК (Hammel et al., 2011). DNA-PK также присоединяется к комплексу Ku70/Ku80, привлекает и активирует другие белки репарации (Sibanda et al., 2017).

BRCA1, BRCA2, RAD51 — ключевые факторы, действующие в процессе репарации с помощью HR, инициирующей при возникновении двунитевых разрывов ДНК. Фосфорилированный киназами CHK2, ATM или ATR, белок BRCA1 накапливается в поврежденных участках ДНК и через связывающий медиатор PALB2 привлекает BRCA2, который рекрутирует рекомбиназу RAD51 (Yamamoto, Hirasawa, 2021). В свою очередь RAD51, используя сестринские хроматиды в качестве матрицы, достраивает поврежденный участок молекулы ДНК (Yamamoto, Hirasawa, 2021).

В настоящей работе мы оценили влияние *Zeb1* на основных участников NHEJ, к которым относятся Ku70, DNA-PK и XRCC4, а также на важные маркеры HR — BRCA1, BRCA2, RAD51, вовлеченные в репарацию повреждений ДНК в линиях клеток РМЖ MCF7-*Zeb1*-TET-ON и MDA-MB-231-*Zeb1*KO.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные культуры. В работе использовали две линии клеток РМЖ: 1) люминального подтипа А — клетки MCF7 со встроенной в геном системой TET-ON (MCF7-*Zeb1*-TET-ON), которая позволяет индуцировать экспрессию *Zeb1* путем добавления в клеточную среду доксицилина; 2) клетки трижды негативного подтипа MDA-MB-231 (контрольные) и MDA-MB-231 с нокаут-ом гена *Zeb1* (MDA-MB-231-*Zeb1*KO) (любезно предоставлены Н. А. Барлевым). Необходимо отметить, что MCF7-*Zeb1*-TET-ON без активации *Zeb1* не отличается от исходной линии MCF7 по морфофункциональным характеристикам. Клетки выращивали в среде DMEM (Gibco, Великобритания), содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, Германия), 0.05 мкг гентамицина и 0.06 % L-глутамин. Клетки культивировали при температуре 37 °C и 5 % CO₂. Для обработки клеток использовали водные растворы 0.5—8 мкМ DOX (Teva, Израиль) и 50 мкМ цисплатина (CIS; Teva, Израиль), а также 50 мкМ ЕТО (Sigma, США), растворенного

в ДМСО. Для индукции экспрессии белка Zeb1 в клетках MCF7-Zeb1-TET-ON в культуральную среду добавляли доксициклин в конечной концентрации 0.5 мкг/мл на 72 ч.

Вестерн-блот-анализ. Клетки, выросшие на чашках Петри, промывали с помощью 1-кратного PBS и лизировали в 600 мкл буфера Лэммли (водный раствор 0.063 M Tris-HCl pH 6.8, 10 % глицерина, 5 % β-меркаптоэтанола, 2 % SDS, 0.004 % бромфенолового синего). Лизат обрабатывали ультразвуком в течение 25 с, нагревали при 97 °C в течение 5 мин. Далее вносили пробы в лунки геля SDS-PAGE и разделяли белки с помощью электрофореза на ТРИС-глициновом рабочем буфере. Затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-RAD, США). Через 40 мин блокирования в 5 %-ном обезжиренном молоке, разведенном в буфере PBST, мембраны инкубировали с первичными антителами в течение 18 ч. После трехкратной промывки PBST использовали вторичные антитела против мышинных или кроличьих антител (разведение 1:10 000; Sigma-Aldrich, США), конъюгированные с пероксидазой хрена. Затем промывали 3 раза в PBST и детектировали иммуномеченные белки с помощью ChemiDoc Touch Imager (Bio-Rad, США).

Использовали первичные антитела к β-actin (Sigma Aldrich, США), DNA-PK (Abcam, США), Ku70 (Santa Cruz, США), а также к Zeb1 и белкам репарации BRCA1, BRCA2 и Rad51, а также к фосфорилированному гистону γH2AX (все от Cell Signaling, США).

ПЦР в реальном времени. Стандартную процедуру выделения тотальной РНК проводили с использованием реагента TRI (Sigma-Aldrich, Missouri, США) в соответствии с инструкциями производителя. Затем кДНК синтезировали методом обратной транскрипции с использованием набора MMLV RT («Евроген», Россия). Для ПЦР в реальном времени использовали смесь qPCR mix-HS SYBR master mix («Евроген», Россия) и GAPDH в качестве внутреннего контроля. Количественную ПЦР в реальном времени проводили на приборе BioRad CFX-96 (BioRad, CA, США).

Общий объем реакции ПЦР составил 20 мкл и включал 2 мкл кДНК, по 0.1 мкл прямого и обратного праймеров, 4 мкл 5-кратной смеси для ПЦР и 13.8 мкл ddH₂O. Программа реакции ПЦР: 95 °C — 5 мин и 40 циклов: 95 °C — 15 с, 60 °C — 15 с и 72 °C — 20 с при фиксации интенсивности свечения SYBR в конце каждого цикла. Относительную экспрессию рассчитывали методом ΔΔCt. Значения Ct-образца были нормализованы по GAPDH.

Для проведения ПЦР в режиме реального времени использовали праймеры, указанные в табл. 1.

Все амплификации проводили в трех повторах.

Оценка жизнеспособности клеток. Для оценки жизнеспособности клеток при воздействии химиотерапевтическим препаратом DOX использовали стандартный МТТ-тест (тиазолил синий тетразолий бромид; «ДИА-М»,

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Ген	Белок	Праймер прямой (F) и обратный (R)
<i>BRCA1</i>	BRCA1	F: CCTTCTACTGTCCTGGCTACTA R: CAGATTTCCAAGGGAGACTTCA
<i>BRCA2</i>	BRCA2	F: TGCCTGAAAACCAGATGACTATC R: AGGCCAGCAAACCTCCGTTTA
<i>DNA-PK</i>	PRKDC	F: GATAACTACCCGCAGGCTATTG R: TCCTTGCCACAACTCCTTATT
<i>Ku70</i>	XRCC6	F: CTCTCAAGCCTCCTCCAATAAA R: CTTGGTATCGCTAGGCAGAAG
<i>Rad51</i>	Rad51	F: CGCCCTTTACAGAACAGACTAC R: ACCACTGCTACACCAAACCTC
<i>XRCC4</i>	XRCC4	F: GCCGCTATTACCGTATCTTACA R: GTGCCAGTGTATCATCAAATC
<i>Actin</i>	ACTA1	F: GGATCAGCAAGCAGGAGTATG R: AGAAAGGGTGTAAACGCAACTAA

Россия). В каждую лунку 96-луночного планшета сеяли 10 000 клеток. Через 1 сут добавляли DOX в необходимых концентрациях на 48 ч. Затем добавляли 10 мкл раствора МТТ (5 мг/мл) в каждую лунку, содержащую 100 мкл полной среды, и выдерживали клетки в течение 3 ч в CO₂-инкубаторе при 37 °C. Далее содержимое лунок удаляли и добавляли по 100 мкл ДМСО в каждую лунку планшета для растворения соли формазана. После инкубации в течение 20 мин перемешивали содержимое лунок встряхиванием и измеряли его оптическую плотность с помощью микропланшетного ридера BioRad iMark (BioRad, США) при облучении светом с длиной волны 570 и 630 (референс) нм. Каждое значение было получено путем усреднения сигнала, полученного при измерении оптической плотности раствора 8 лунок.

Оценка активности апоптоза. Количество вступивших в апоптоз клеток оценивали методом проточной цитофлюориметрии с применением двойного окрашивания с помощью флуоресцентно-меченного аннексина V и красителя 7-аминоактиномицина (7-AAD), используя набор annexin-V-FITC и 7-AAD в соответствии с соответствующим протоколом производителя (BD Biosciences, США). Анализировали влияние CIS и ЕТО на гибель клеток. Клетки обрабатывали в течение 48 ч ЕТО (50 мкМ) или CIS (50 мкМ). Измерения проводили с помощью проточного цитофлуориметра CytoFLEX (Beckman Coulter, США) с использованием соответствующих каналов в трех независимых экспериментах. Анализировали минимум по 5000 клеток в одном эксперименте.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов осуществляли, используя программу GraphPad Prism 8. Сравнение данных проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента и критерия Манна-Уитни при уровне значимости $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы оценивали влияние *Zeb1* на основные системы репарации двунитевых повреждений ДНК — HR и NHEJ в клетках MCF7-Zeb1-TET-ON РМЖ люминального подтипа А и трижды негативного подтипа MDA-MB-231-Zeb1KO. Люминальный подтип А РМЖ характерен наличием рецепторов эстрогена (ER) и прогестерона (PR) и отсутствием рецептора эпидермального фактора роста человека 2 (HER2) (Błaszczak et al., 2025). Для этого подтипа РМЖ характерны низкая степень злокачественности, наилучший прогноз, более низкая частота рецидивов и повышенная выживаемость пациентов. При лечении люминального подтипа А рака молочной железы гормональная терапия является более эффективной по сравнению с химиотерапией (Higgins, Stearns, 2009). Тройной негативный рак молочной железы (TNBC), характеризующийся отсутствием рецепторов ER, PR и HER2, является одним из наиболее трудно поддающихся лечению подтипов РМЖ, поскольку он ассоциирован с высокой частотой рецидивов и метастазирования, а также с низкой общей выживаемостью пациентов (Błaszczak et al., 2025).

Для оценки повреждений ДНК мы количественно определяли уровень фосфорилированного по серину 139 гистона H2AX (γ -H2AX) с помощью Вестерн-блоттинга. Фосфорилирование гистона H2AX в этом сайте служит классическим маркером двунитевых разрывов, и его уровень напрямую коррелирует с интенсивностью повреждений ДНК (Xu et al., 2024). Для индукции образования двунитевых разрывов использовали DOX, который считается одним из наиболее эффективных препаратов для лечения трижды негативного подтипа РМЖ (Wang et al., 2016). С помощью Вестерн-блот-анализа нами было показано, что в обеих клеточных линиях РМЖ — MCF7 и MDA-MB-231 высокий уровень экспрессии транскрипционного фактора *Zeb1* ассоциирован со снижением уровня фосфорилированного гистона γ H2AX (рис. 1а). Наши результаты согласуются с данными авторов, которые показали, что *Zeb1* в клетках MCF7 способствует устранению разрывов ДНК, индуцированных ионизирующим излучением, что сопровождается снижением уровня γ H2AX (Zhang et al., 2014), а также с данными других авторов, согласно которым оверэкспрессия *Zeb1* значительно снижает уровень γ H2AX, вызванный воздействием эпирубицином или ЕТО на клетки MDA-MB-231 (Zhang et al., 2018).

Согласно полученным данным, индукция экспрессии *Zeb1* в клеточной линии MCF7-Zeb1-TET-ON приводит к подавлению экспрессии ключевых участников гомологичной рекомбинации (HR) — BRCA1, BRCA2 и RAD51 — и на уровне белка, и на уровне мРНК (рис. 1). Однако обработка доксорубицином вызывает увеличение уровня мРНК *BRCA1* и *BRCA2* при индукции *Zeb1* (рис. 1б). Одновременно с этим мы наблюдали повышение уровня протеинкиназы DNA-PK — ключевого фермента пути негомологичного соединения концов (NHEJ). При этом показано, что уровни других участников NHEJ (белков

XRCC4 и Ku70) значимых изменений не претерпевают. Совокупность этих данных свидетельствует о том, что в клетках MCF7-Zeb1-TET-ON фактор *Zeb1* ингибирует путь HR и стимулирует путь NHEJ, по крайней мере частично, за счет активации DNA-PK.

В клетках MDA-MB-231-Zeb1KO при потере *Zeb1* происходит подавление всех анализируемых в данной работе регуляторов репарации: белков BRCA1, BRCA2, RAD51, DNA-PK (*PRKDC*), Ku70 (*XRCC6*) и XRCC4 (рис. 1). Стоит отметить, что при воздействии доксорубицина на MDA-MB-231-Zeb1KO, как и на MCF7-Zeb1-TET-ON с индуцированной экспрессией *Zeb1*, происходит повышение уровня мРНК этих факторов (рис. 1б). Вероятно, DOX вызывает компенсаторное увеличение экспрессии генов репарации. Таким образом, в MDA-MB-231-Zeb1KO белок *Zeb1* активирует экспрессию генов, кодирующих факторы HR и NHEJ, при возникновении двунитевых повреждений в молекуле ДНК.

Согласно данным из литературы, с одной стороны, *Zeb1* напрямую участвует в инициации репарации двунитевых разрывов ДНК по пути HR, стимулируя экспрессию киназы ATM, что в свою очередь способствует фосфорилированию гистона H2AX (с образованием γ H2AX) в областях двунитевых разрывов ДНК (Zhang et al., 2014). С другой стороны, известно, что с участием *Zeb1* к сайтам двунитевых разрывов рекрутируется белок 53BP1 (сенсор повреждения ДНК, участвующий в выборе пути репарации), который направляет репарацию через путь NHEJ и одновременно подавляет путь HR (Genetta et al., 2023).

Важно отметить, что в двух исследованных нами клеточных моделях фактор *Zeb1* оказывает разнонаправленное регуляторное влияние на путь HR. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в разных молекулярных подтипах рака молочной железы *Zeb1* по-разному модулирует системы репарации ДНК. При этом в обоих случаях его активность, в конечном счете, способствует усилению репарационных процессов, что подтверждается снижением уровня маркера двунитевых разрывов гистона γ -H2AX.

Мы предполагаем, что разнонаправленное влияние *Zeb1* на ключевых участников пути HR можно объяснить различиями клеточных контекстов, которые модулируют его регуляторную функцию при выборе пути репарации ДНК. В частности, в клетках MCF7-Zeb1-TET-ON активация пути NHEJ в ущерб точного HR может приводить к ошибкам при восстановлении ДНК. Это, в свою очередь, способствует повышению геномной нестабильности и, как следствие, увеличению онкогенного потенциала данных клеток. Для проверки этой гипотезы перспективным направлением дальнейших исследований могло бы стать сравнительное изучение скорости накопления мутаций в клетках люминального и тройного негативного подтипов РМЖ.

Известно, что устойчивость к химиотерапевтическим препаратам может возникать благодаря усилению

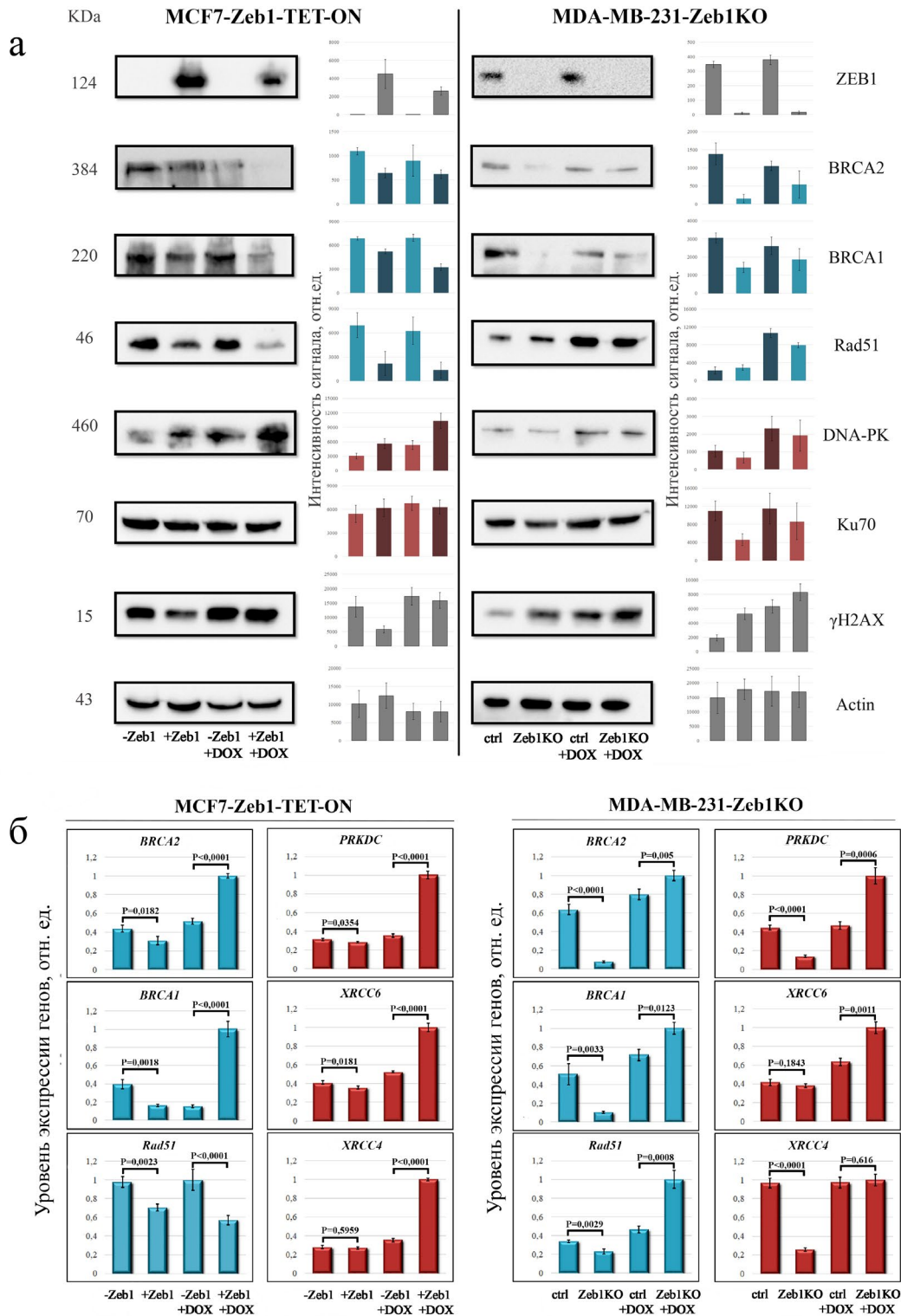


Рис. 1. Изменение уровня участников репарации двунитевых разрывов ДНК с помощью HR (выделены голубым цветом) или NHEJ (выделены красным цветом) при варьировании уровня Zeb1 в клетках MCF7-Zeb1-TET-ON и MDA-MB-231-Zeb1KO и воздействии на них доксорубицином (DOX) в концентрации 0.5 мкг/мл. *а* — Результаты вестерн-блот-анализа; на гистограммах показаны средние значения и их стандартные отклонения из трех экспериментов. *б* — Результаты ПЦР в реальном времени; даны средние значения и их стандартные ошибки из трех измерений (*t*-критерий Стьюдента, $P < 0.05$)

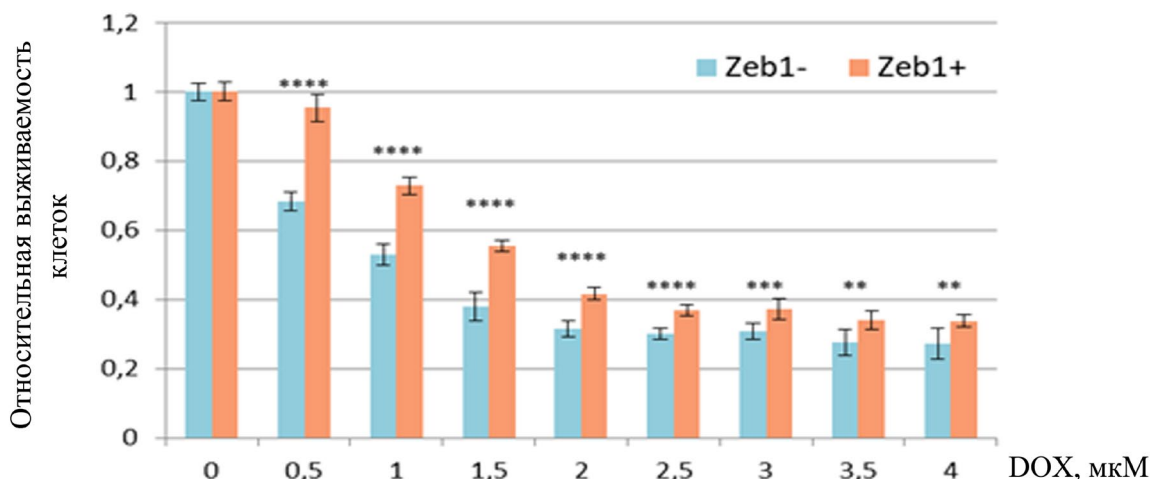


Рис. 2. Данные МТТ-теста на выживаемость клеток MCF7-Zeb1-TET-ON при добавлении в клеточную среду доксорубина (DOX) на 2 сут в различных концентрациях. Даны средние значения и стандартные отклонения из 8 повторов каждого измерения. Различия с контролем (Zeb1-) достоверны при: $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***), $P < 0.001$ (****); t -критерий Стьюдента, $P < 0.05$

интенсивности процессов репарации повреждений ДНК, в том числе и восстановления двунитевых разрывов (Nesic et al., 2025). С помощью МТТ-теста мы показали, что усиление экспрессии *Zeb1* в клетках линии MCF7-Zeb1-TET-ON приводит к повышению устойчивости клеток РМЖ к DOX (рис. 2). Мы предполагаем, что наблюдаемая *Zeb1*-индуцированная устойчивость обусловлена повышением интенсивности процессов репарации ДНК, что позволяет клеткам избегать гибели. Механизм этого эффекта заключается в том, что нерепарированные двунитевые разрывы нарушают целостность генома, что служит мощным сигналом для индукции апоптоза (Nesic et al., 2025).

Для проверки этой гипотезы мы оценили уровень апоптоза методом проточной цитометрии с двойным окрашиванием Annexin V и 7AAD. Нами было показано, что индукция экспрессии *Zeb1* в клетках MCF7-Zeb1-TET-ON повышает их устойчивость к ДНК-повреждающему агенту ЕТО (рис. 3), механизм действия которого аналогичен действию DOX, но который, в отличие от последнего, не обладает автофлюоресценцией в красной области спектра. Аналогичный протекторный эффект *Zeb1* наблюдали и при обработке клеток другим генотоксическим препаратом — CIS (50 мкМ) (рис. 3). Количественный анализ подтвердил выраженный антиапоптотический эффект *Zeb1*: в присутствии ЕТО уровень апоптоза в среднем снижался с 20 до 1.5 %, а при обработке CIS — с 24 до 1.5 %. Эти результаты подтверждают, что *Zeb1* существенно повышает выживаемость клеток в условиях генотоксического стресса. Мы предполагаем, что такой эффект опосредован усилением репарации ДНК, и это приводит к более эффективному устранению повреждений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы установлено, что транскрипционный фактор *Zeb1* по-разному регулирует репарацию двунитевых разрывов ДНК в различных подтипах рака молочной железы (рис. 4). В клетках люминального подтипа MCF7 он подавляет ключевые компоненты пути рекомбинации HR — белки BRCA1, BRCA2 и RAD51 — и активирует протеинкиназу DNA-ПК, ключевой фермент пути NHEJ. В условиях генотоксического стресса это приводит к значительному повышению выживаемости клеток за счет подавления апоптоза. Напротив, в клетках тройного негативного РМЖ MDA-MB-231 фактор *Zeb1* усиливает экспрессию участников обоих путей репарации — как HR, так и NHEJ (белков DNA-ПК, Ku70, XRCC4). Таким образом, мы полагаем, что *Zeb1* играет ключевую роль в регуляции репарации ДНК и формировании резистентности к химиотерапевтическим препаратам в клетках РМЖ. Полученные данные демонстрируют, что влияние *Zeb1* на выбор пути репарации зависит от клеточного контекста, что, вероятно, и объясняет разнонаправленность его воздействия на систему HR в люминальном и тройном негативном подтипах опухоли молочной железы.



Рис. 4. Схема, показывающая влияние фактора *Zeb1* на механизмы репарации HR и NHEJ в клетках РМЖ MCF7 и MDA-MB-231

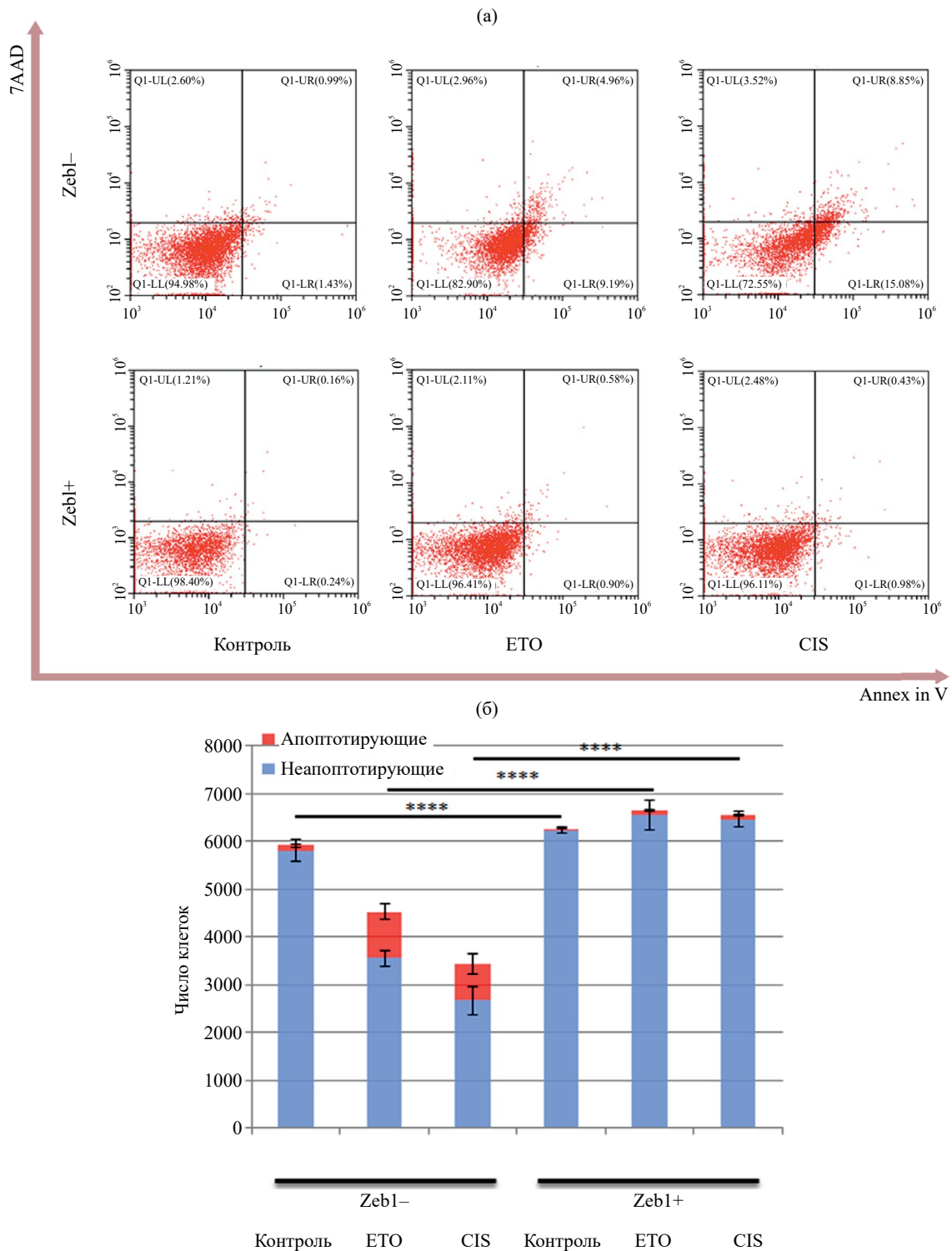


Рис. 3. Данные проточной цитофлуориметрии, выявляющие апоптотические клетки MCF7-Zeb1-TET-ON (с использованием annexin V) после воздействия этопозидом (ЕТО) или цисплатином (СИС) в концентрациях по 50 мкМ/л в течение 24 ч (a) и соответствующие им численные гистограммы (b). Светлые столбцы гистограммы (b, голубые, жизнеспособные клетки) включают значения, попавшие в квартильную область Q1-LL, темные столбцы (красные, апоптотические клетки) представляют собой совокупность значений, попавших в квартили Q1-UR и Q1-LR; показаны средние значения и их стандартные отклонения из трех измерений; различия достоверны при $P < 0.001$ (***) (t -критерий Стьюдента)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Błaszczak E., Miziak P., Odrzywolski A., Baran M., Gumbarewicz E., Stepulak A.* 2025. Triple-Negative Breast Cancer Progression and Drug Resistance in the Context of Epithelial–Mesenchymal Transition. *Cancers*. V. 17.2. Art. ID: 228. <https://doi.org/10.3390/cancers17020228>
2. *Cao M., Lu H., Yan S., Pang H., Sun L., Li C., Chen X., Liu W., Hu J., Huang J., Xing Y., Zhang N., Chen Y., He T., Zhao D., Sun Y., Zhao L., Liu X., Cai L.* 2023. Apatinib plus etoposide in pretreated patients with advanced triple-negative breast cancer: a phase II trial. *BMC Cancer*. V. 23.1. Art. ID: 463. <https://doi.org/10.1186/s12885-023-10768-8>
3. *Chang H. H., Pannunzio N. R., Adachi N., Lieber M. R.* 2017. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* V. 18. P. 495. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>
4. *Chen X., He Y., Fan T., Wei Y.* 2025. Efficacy and safety of low-dose oral etoposide combined with capecitabine for patients with postoperative metastatic breast cancer resistant to anthracycline/taxanes. *Thoracic Cancer*. V. 16. 3. Art. ID: e70003. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.70003>
5. *Gartner A., Engebrecht J. A.* 2022. DNA repair, recombination, and damage signaling. *Genetics*. V. 220. Art. ID: 178. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyab178>
6. *Genetta T. L., Hurwitz J. C., Clark E. A., Herold B. T., Khalil S., Abbas T., Larner J. M.* 2023. Zeb1 promotes non-homologous end joining double-strand break repair. *Nucleic Acids Research*. V. 51. P. 9863. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad723>
7. *Hammel M., Rey M., Yu Y., Mani R. S., Classen S., Liu M., Pique M. E., Fang S., Mahaney B. L., Weinfeld M., Schriemer D. C., Lees-Miller S.P., Tainer J. A.* 2011. XRCC4 protein interactions with XRCC4-like factor (XLF) create an extended grooved scaffold for DNA ligation and double strand break repair. *J. Biol. Chem.* V. 286. P. 32638. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.272641>
8. *Higgins M. J., Stearns V.* 2009. Understanding resistance to tamoxifen in hormone receptor — positive breast cancer. *Clinical Chemi.* V. 55. P. 1453. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.125377>
9. *Long L., Xiang H., Liu J., Zhang Z., Sun L.* 2019. ZEB1 mediates doxorubicin (Dox) resistance and mesenchymal characteristics of hepatocarcinoma cells. *Exper. Mol. Pathol.* V. 106. P. 116. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2019.01.001>
10. *Lu Q., Chen W., Ji Y., Liu Y., Xue X.* 2022. Ursolic acid enhances cytotoxicity of doxorubicin-resistant triple-negative breast cancer cells via ZEB1-AS1/miR-186-5p/ABCC1 axis. *Cancer Biother. Radiopharm.* V. 37. P. 673. <https://doi.org/10.1089/cbr.2020.4147>
11. *Mourrain L., Boissonneault G.* 2021. DNA repair in haploid context. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. Art. ID: 12418. <https://doi.org/10.3390/ijms222212418>
12. *Moyret-Lalle C., Prodhomme M. K., Burlet D., Kashiwagi A., Petrilli V., Puisieux A., Seimiya H., Tissier A.* 2022. Role of EMT in the DNA damage response, double-strand break repair pathway choice and its implications in cancer treatment. *Cancer Sci.* V. 113. P. 2214. <https://doi.org/10.1111/cas.15389>
13. *Nemoz C., Ropars V., Frit P., Gontier A., Drevet P., Yu J., Guerois R., Pitois A., Comte A., Delteil C., Barboule N., Legendrand P., Bacconnais S., Yin Y., Tadi S., Barbet-Massin E., Berger I., Le Cam E., Modesti M., Rothenberg E., Calsou P., Charbonnier J. B.* 2018. XLF and APLF bind Ku80 at two remote sites to ensure DNA repair by non-homologous end joining. *Nature Struct. Mol. Biol.* V. 25. P. 971. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0133-6>
14. *Nesic K., Parker P., Swisher E. M., Kraus J. J.* 2025. DNA repair and the contribution to chemotherapy resistance. *Genome Med.* V. 17. P. 62. <https://doi.org/10.1186/s13073-025-01488-8>
15. *Schreiber A. R., Smoots S. G., Jackson M. M., Bagby S. M., Dus E. D., Dominguez A. T., Binns C. A., Pitts T. M., Diamond J. R.* 2025. Potentiating doxorubicin activity through BCL-2 inhibition in p53 wild-type and mutated triple-negative breast cancer. *Front. Oncol.* V. 15. P. Art. ID: 1549282. <https://doi.org/10.3389/fonc.2025>
16. *Schwab A., Rao Z., Zhang J., Gollowitzer A., Siebenkäs K., Bindel N., D'Avanzo E., Roey R., Hajjaj Y., Özel E., Armstark I., Bereuter L., Su F., Grander J., Rad E. B., Groenewoud A., Engel F. B., Bell G. W., Henry W. S., Friedmann*

- Angeli J. P., Stemmler M. P., Brabletz S., Koeberle A., Brabletz T.* 2024. Zeb1 mediates EMT/plasticity-associated ferroptosis sensitivity in cancer cells by regulating lipogenic enzyme expression and phospholipid composition. *Nature Cell Biol.* V. 26. P. 1470.
<https://doi.org/10.1038/s41556-024-01464-1>
17. *Sibanda B. L., Chirgadze D. Y., Ascher D. B., Blundell T. L.* 2017. DNA-PKcs structure suggests an allosteric mechanism modulating DNA double-strand break repair. *Science.* V. 355. P. 520.
<https://doi.org/10.1126/science.aak9654>
18. *Wang H., Yu Y., Jiang Z., Cao W. M., Wang Z., Dou J., Zhao Y., Cui Y., Zhang H.* 2016. Next-generation proteasome inhibitor MLN9708 sensitizes breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis. *Scientific Reports.* V. 6. Art. ID: 26456.
<https://doi.org/10.1038/srep26456>
19. *Wang Q., Liang D., Shen P., Yu Y., Yan Y., You W.* 2021. Hsa_circ_0092276 promotes doxorubicin resistance in breast cancer cells by regulating autophagy via miR-348/ATG7 axis. *Translat. Oncol.* V. 14.8. Art. ID: 101045.
<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101045>
20. *Xu J., Zhang Z., Hu H., Yang Y., Xiao C., Xi L., Lu J., Tian S., Zhao H.* 2024. Synergistic antitumor effects of peiminine and doxorubicin on breast cancer through enhancing DNA damage via ZEB1. *Biomed. Pharmacother.* V. 173. Art. ID: 116353.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116353>
21. *Yamamoto H., Hirasawa A.* 2021. Homologous recombination deficiencies and hereditary tumors. *Int. J. Mo. Sci.* V. 23. Art. ID: 348.
<https://doi.org/10.3390/ijms23010348>
22. *Zhang P., Sun Y., Ma L.* 2015. ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle.* V. 14. P. 481.
<https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1006048>
23. *Zhang P., Wei Y., Wang L. I., Debeb B. G., Yuan Y., Zhang J., Yuan J., Wang M., Chen D., Sun Y., Woodward W. A., Liu Y., Dean D. C., Liang H., Hu Y., Ang K. K., Hung M. C., Chen J., Ma L.* 2014. ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1. *Nature Cell Biol.* V. 16. P. 864.
<https://doi.org/10.1038/ncb3013>
24. *Zhang X., Zhang Z., Zhang Q., Zhang Q., Sun P., Xiang R., Ren G., Yang S.* 2018. ZEB1 confers chemotherapeutic resistance to breast cancer by activating ATM. *Cell Death Disease.* V. 9. P. 57.
<https://doi.org/10.1038/s41419-017-0087-3>