

ВЛИЯНИЕ АКТИВИРУЮЩИХ МУТАЦИЙ V600 ГЕНА *B-RAF* НА СПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ К АУТОФАГИИ

О.О. Рябая, И.В. Цыганова, Т.А. Сидорова, О.С. Бурова, Е.В. Степанова
ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, г. Москва

Ключевые слова: аутофагия, меланома, мутации в гене *B-RAF*, химиорезистентность

Цель работы. Исследована взаимосвязь статуса гена *B-RAF* со степенью активации аутофагии в клеточных линиях меланомы человека *in vitro*.

Материалы и методы. В работе были использованы 12 клеточных линий меланом человека. Наличие мутаций гена *B-RAF* в клетках определяли методом ПЦР, уровень экспрессии мРНК гена *Beclin1* — методом ОТ-ПЦР. Анализ экспрессии и аккумуляции белка LC3B, специфически ассоциированного с мембранами аутофагосом, проводили иммуноцитохимическим методом.

Результаты. Среди исследованных клеточных линий 7 имели активирующие мутации в гене *B-RAF*. Базальный уровень экспрессии мРНК гена *Beclin1* регистрировали в клетках всех исследованных линий меланомы. Его величина варьировала в широком диапазоне от 0,15 до 1,16 о.е. Голодание клеточных линий приводило к увеличению экспрессии мРНК *Beclin1* в клетках *B-RAF^{wt}*, а в *B-RAF^{V600}* клеточных линиях он практически не менялся. Однако противоопухолевый препарат темозоломид увеличивал количество аутофагосом в клетках меланомы человека с разным статусом *B-RAF*.

Выводы. Активирующие мутации в гене *B-RAF* могут влиять на уровень аутофагии в клетках меланомы *in vitro*. Изучение механизмов этого процесса позволит разработать новые факторы предсказания лекарственной устойчивости меланомы и выявить оригинальные мишени для противоопухолевой терапии.

Введение

Лечение метастатических меланом с использованием стандартных режимов химиотерапии и биотерапии остается недостаточно эффективным [1]. Полагают, что это связано большей частью с резистентностью меланомных клеток к запуску апоптоза вследствие активации сигнальных путей выживаемости клеток [2]. Активно идет поиск новых подходов к предсказанию химиорезистентности и повышению чувствительности опухолевых клеток к противоопухолевым препаратам [3]. Среди них блокирование сигнального пути митоген-активированной киназы (МАРК) показало высокую эффективность при меланоме. Так, обнаружено, что он постоянно активирован в меланоме человека [3–6] с мутациями в генах *B-RAF* или *N-RAS* (40–60% от всех больных меланомой) [7], что сделало его привлекательной мишенью для разработки новых таргетных препаратов для лечения меланомы.

Наиболее часто встречаемыми и значимыми мутациями в гене *B-RAF* являются V600E и V600K

(замена валина в позиции 600 в 15-м экзоне на глутаминовую кислоту и лизин соответственно). Обе мутации приводят к значимой активации Ras-Raf-MEK-ERK сигнального пути, регулирующего пролиферацию и выживаемость опухолевых клеток [3]. Показано: они увеличивают резистентность меланомных клеток к противоопухолевым препаратам путем ингибирования запуска апоптоза [5].

Однако гибель опухолевых клеток, устойчивых к апоптозу, может пойти по пути активации неконтролируемой аутофагии. При этом недавно обнаруженном процессе клетка способна самостоятельно расщеплять собственные компоненты и долгоживущие белки и повторно использовать их в неблагоприятных условиях, например, при недостатке кислорода и/или питательных веществ [8]. Хотя аутофагия рассматривается как основной механизм выживаемости клеток, неконтролируемая чрезмерная ее активация ведет к изменению баланса в сторону саморазрушения и гибели клеток (т. н. запрограммированная гибель II типа). Она характеризуется формированием вакуолей с двойной мембраной (аутолизосом), содержащих цитоплазматические образования клетки. Необходимым компонентом аутолизосом являются белки LC3A и LC3B (microtubule-associated protein 1 light chain 3A

Адрес для корреспонденции

Степанова Е.В.
E-mail: oxa2601@yandex.ru

или В) — гомологи белка дрожжей, ассоциированного с аутофагией (Atg8). Другой белок Beclin1 — аналог белка Atg6 дрожжей — также необходим для формирования аутолизосом [9].

Накапливается все больше данных, что активирующие мутации в гене *B-RAF* влияют на способность меланомных клеток к аутофагии. Одним из возможно реализуемых механизмов влияния является опосредованная ERK киназой индукция слияния аутофагосомы с лизосомой [6]. Также показано, что гиперэкспрессия мутантного *B-RAF* в клетках меланомы, с одной стороны, приводит к усилению базального уровня аутофагии, с другой — тормозит mTORC1-зависимую аутофагию [10]. Однако большинство исследований проведены на генетически модифицированных клеточных линиях при блокировании или активации экспрессии *B-RAF* дикого/мутантного типа, что не позволяет сделать выводы о значимости влияния этих мутаций на способность клеток к аутофагии на общей популяции меланомных больных.

Целью проведенного исследования было исследовать различия в активации аутофагии в клеточных линиях меланомы человека с нормальным и мутированным геном *B-RAF*.

Материалы и методы

Реагенты и препараты: TRIzol-реагент, Tris-HCl (Sigma), борная кислота, ЭДТА, агароза квалификации «Biothech grade» (Хеликон, Россия); бромистый этидиум (Serva, Германия); изопропиловый спирт, ДМСО, NaOH (Roth, Германия), хлороформ (Химмед, Россия). M-MuLV обратная транскриптаза RevertAid, Taq-полимераза, реакционные буферы, маркеры молекулярной массы ДНК с длиной фрагментов 100 п.н. (все — Fermentas, Литва); смесь дезоксинуклеотидов (Хеликон, Россия); гексамеры, праймеры для генов бета-актин (β -*Actin*, АСТ) и Beclin1 синтезированы в фирме Литех (Россия). Химиопрепараты Дакарбазин, Нимустин, Темозоломид (все — Sigma, США), Паклитаксел (Интаксел, Фрезениус Каби Дойчланд ГмбХ, Германия).

Клеточные линии. В работе были использованы 12 клеточных линий метастатической меланомы человека, полученных в НИИ ЭДТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН. Клеточные линии культивировали на полной питательной среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка (ТЭС, NuClone, США); 2 мМ/мл глутамина, 50 мг/мл пенициллин-стрептомицина (ПанЭко, Россия) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂.

Определение активирующих мутаций в гене *B-RAF*. Наличие мутаций гена *B-RAF* в клетках определяли методом ПЦР. Выделение тотальной ДНК из клеточных линий меланомы человека выполняли с помощью набора для выделения и очистки нуклеиновых кислот QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия).

Для постановки ПЦР на 15-м экзоне *B-RAF* использовали следующие праймеры:

F: 5'-ACCTAAACTCTTCATAATGCT-3' и R: 5'-CCATCAGTTTGAACAGTTGT-3'. Амплификацию проводили в следующих условиях: начальная денатурация при 95 °С (4 мин), 40 циклов амплификации (30 с — денатурация при 95 °С, 30 с — отжиг праймеров при 52 °С, 30 с — элонгация при 72 °С), завершающий этап элонгации при 72 °С (5 мин).

Определение уровня экспрессии мРНК Beclin1. Детекцию экспрессии мРНК Beclin1 определяли с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Для этого клетки (5×10⁵) вносили на 6-луночные планшеты в полной среде. На следующий день полную среду меняли на новую (базальный уровень белка) или на RPMI-1640, не содержащей ТЭС (активация экспрессии белка, вызванная голоданием). Через 24 ч клетки лизировали, используя реагент TRIzol. Из лизата клеток выделяли тотальную РНК в системе хлороформ-изопропиловый спирт.

Обратную транскрипцию проводили в соответствии со стандартным протоколом [11]. Реакцию проводили в амплификаторе «Терцик» (Россия) по программе: 24 °С — 10 мин, 42 °С — 50 мин и 70 °С — 15 мин. Использовали следующие праймеры для гена *Beclin1* F: 5'-AAGACAGAGCGATGGTAG-3' и R: 5'-CTGGGCTGTGGTAAGTAA-3' (продукт 282 н.п.); для β -*Actin* 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' и 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3' (продукт 460 н.п.). Условия амплификации: предварительная обработка — 94 °С — 2 мин; денатурация ДНК — 94 °С — 30 с; отжиг праймеров — 62 °С — 30 с; элонгация — 72 °С — 1 мин (для *Beclin1*, 26 циклов), а также 94 °С — 2 мин; 94 °С — 20 сек; 60 °С — 20 с; 72 °С — 45 с (для β -*Actin*, 24 цикла). Продукты амплификации анализировали после электрофореза в 1,5% агарозном геле, содержащем бромистый этидий в стандартной концентрации. Уровень экспрессии *Beclin1* оценивали в относительных единицах оптической плотности (о.е.) с помощью программы «ImageJ» по отношению к уровню β -*Actin*.

Иммуноцитохимическое исследование. Клетки наращивали на стеклах до 70% монослоя. После инкубации с химиопрепаратами в течение 24 ч клетки фиксировали в спирте и ацетоне. Клетки инкубировали с первичными поликлональными кроличьими антителами к LC3В белку (разведение 1:2000, Invitrogen, США), при +4 °С в течение 18 ч. После чего клетки промывали и инкубировали с вторичными антикроличьими антителами, меченными флуорохромом AlexaFluor® (Life Technologies, США), а затем с Хекстом 33258 (ПанЭко, Россия). Клетки заключали под покровные стекла с использованием полимерной среды Fluorescent mounting medium (Dako, Дания). Анализ образцов проводили на флуоресцентном микроскопе Nikon 80i при 465–495 нм.

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием программы GraphPad Prism v.5.0. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента или χ^2 критерию. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Влияние мутации V600 гена *B-RAF* на базальный уровень аутофагии в клеточных линиях меланомы человека

На панели клеточных линий метастатической меланомы (более 30 пассажей), полученных от больных, проходивших лечение в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, был изучен базальный (constitutive) уровень аутофагии по экспрессии мРНК *Beclin1*. Среди 12 исследованных клеточных линий 7 имели активирующие мутации в гене *B-RAF*: 6 – V600E и 1 – V600K. 5 клеточных линий имели нормальный тип гена *B-RAF*.

Базальный уровень экспрессии мРНК гена *Beclin1* регистрировали в клетках всех исследованных линий меланомы (рис. 1 А и Б). Величина его базальной экспрессии варьировала от 0,15–0,26 до 0,82–1,16 о.е. Средний уровень экспрессии *Beclin1* составил $0,42 \pm 0,28$ о.е. в *B-RAF*^{wt} и $0,65 \pm 0,32$ о.е. в *B-RAF*^{V600} клетках ($p=0,66$). Хотя уровень экспрессии белка Beclin1 не коррелировал с наличием мутаций в меланомных клетках, 60% клеточных линий *B-RAF*^{wt} и 14,3% *B-RAF*^{V600} имели уровень экспрессии Beclin1 менее 0,3 о.е. ($p=0,22$).

Кроме того, с помощью иммуноцитохимического окрашивания клеток мы исследовали аккумуляцию белка LC3В, который специфически ассоциирован с мембранами аутофагосом [4]. При практически отсутствующей аутофагии клетки имеют диффузное распределение LC3В в цитоплазме, тогда как при активно идущем процессе белок локализуется в точечных структурах (punctate), которые соответствуют аутофагичным вакуолям. Как показано на рис. 1 В, мы наблюдали небольшое количество LC3В-положительных точечных структур в клеточных линиях с низким уровнем мРНК гена *Beclin1* (например, Mel Rac) и повышение их количества в клетках с высокой экспрессией *Beclin1* (например, Mel P). При этом увеличивается также количество LC3В-положительных клеток (от 20 до 100%).

Влияние мутации V600 гена *B-RAF* на аутофагию, активированную голоданием, в клеточных линиях меланомы

Недостаток питательных веществ (голодание) является универсальным активатором аутофагии. Для

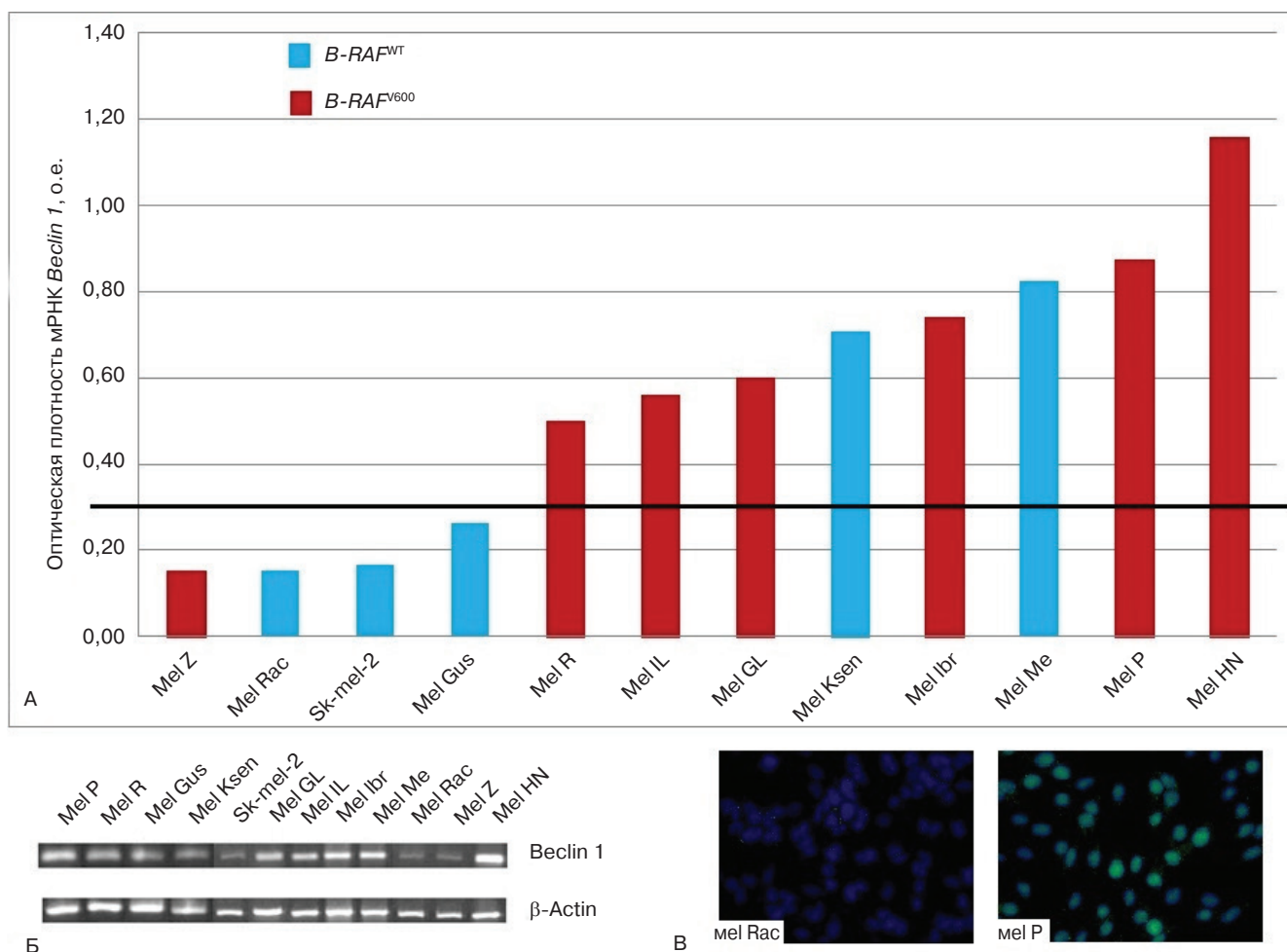


Рис. 1. А. Базальный уровень аутофагии в клеточных линиях меланомы человека в зависимости от активирующих мутаций V600 в гене *B-RAF*. Б. Анализ экспрессии мРНК гена *Beclin1* на клеточных линиях меланомы человека. Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР. В. Иммуноцитохимическое окрашивание клеточных линий Mel Rac и Mel P на аккумуляцию белка LC3В, который специфически ассоциирован с мембранами аутофагосом (ув. $\times 400$)

того чтобы оценить способность клеточных линий меланомы к запуску аутофагии, мы инкубировали клетки в питательной среде RPMI-1640 без добавления ТЭС и незаменимых аминокислот в течение 24 ч. Уровень аутофагии оценивали по экспрессии мРНК гена *Beclin1*. Показано, что в 6 линиях меланомы (mel 1br, mel P, mel R, mel Gi, mel Me и mel IL) не наблюдали значительного изменения уровня экспрессии белка (соотношение мРНК гена *Beclin1* в условиях голодания к норме колеблется от 0,94 до 1,28). В 5 линиях (mel Gus, mel Ksen, Sk-mel-2, mel Ras и mel Z) наблюдали значительное повышение уровня экспрессии мРНК белка в условиях недостатка питательных веществ (от 1,81 до 5,70), а в одной (mel HN) — снижение (до 0,48).

Культивирование клеточных линий в среде без питательных веществ приводило к увеличению экспрессии *Beclin1* в 2–5 раз в клетках *B-RAF^{wt}*, в то время как в *B-RAF^{V600}* клеточных линиях он практически не менялся (рис. 2). В среднем уровень экспрессии *Beclin1* возрос в $2,54 \pm 0,82$ раза в *B-RAF^{wt}* клеточных линиях и в $1,22 \pm 0,27$ — в *B-RAF^{V600}* ($p=0,11$).

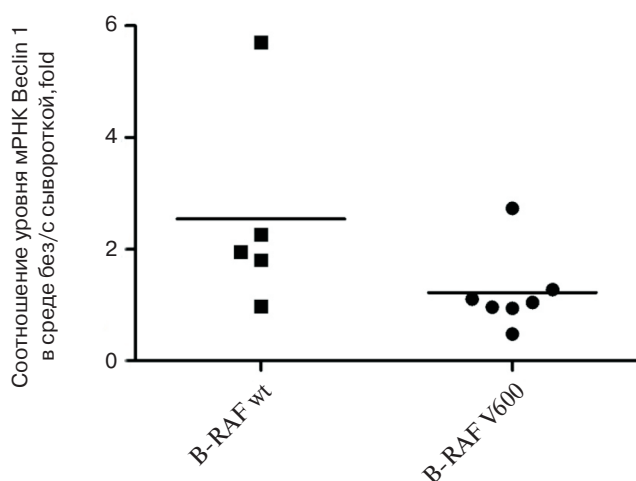


Рис. 2. Изменение экспрессии *Beclin1* в клеточных линиях меланомы с *B-RAF^{wt}* и *B-RAF^{V600}* при инкубации клеток в условиях недостатка питательных веществ (голодании) ($p=0,11$)

Влияние мутации V600 гена *B-RAF* на аутофагию, индуцированную противоопухолевым препаратом темозоломидом, в клеточных линиях меланомы

Известно, что некоторые противоопухолевые химиопрепараты могут запускать аутофагию в культурах опухолевых клеток. В частности, для меланом индукторами аутофагии оказались препараты — темозоломид (алкилирует гуанин в положении O⁶ и N⁷), бортезомиб (ингибитор 26S протеасомы), рапамицин (ингибитор mTOR), тамоксифен (ингибитор 17 β -эстрадиола) [12–14].

Индукцию аутофагии под действием противоопухолевых препаратов мы исследовали с использованием темозоломида на клетках двух линий меланомы с разным статусом *B-RAF* (Mel Z и Mel Ras). По нашим данным, наблюдалось значимое

увеличение количества LC3B-положительных клеток и количества окрашенных точечных структур в клетках обеих линий, обработанных темозоломидом (20 мМ в течение 24 ч), по сравнению с контролем.

Выводы

Полученные нами результаты свидетельствуют, что активирующие мутации в гене *B-RAF* могут влиять на уровень аутофагии в клетках меланомы: базальный уровень в клетках *B-RAF^{V600}* выше, чем в *B-RAF^{wt}*. Однако в условиях недостатка питательных веществ он практически не менялся в *B-RAF^{V600}* клетках, тогда как в *B-RAF^{wt}* клетках происходила индукция аутофагии. Однако эти различия не достигали статистической достоверности, что, возможно, свидетельствует о других возможных регуляторах аутофагии в клетках меланомы.

Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей, использующих в качестве экспериментальных моделей линии клеток меланомы [13]. Так, показано, что *B-RAF^{wt}* клеточная линия меланомы была чувствительна к индукции аутофагии бортезомибом и рапамицином, тогда как две клеточные линии с мутациями *B-RAF^{V600E}* или *B-RAF^{V600K}* — нет [13]. Предполагают, что онкогенные мутации в гене *B-RAF* ассоциированы с резистентностью к запуску аутофагии. При этом нокаут гена *B-RAF* не повышал уровень аутофагии при добавлении к клеткам бортезомиба, что свидетельствует о вовлечении других дополнительных механизмов регуляции, независимых от этого онкогена. Таким образом, авторы полагают, что использование бортезомиба в комбинации с другими индукторами аутофагии является многообещающим подходом для лечения меланомы с нормальным статусом гена *B-RAF*, но не мутированным. Однако в нашем исследовании показано, что темозоломид в концентрации 20 мМ индуцирует аутофагию как в *B-RAF*-нормальных, так и *B-RAF*-мутированных клетках.

Значение аутофагии для роста и прогрессии меланомы человека слабо изучено. Иммуногистохимическое изучение показало, что увеличение количества клеток с признаками аутофагии (LC3A-или Beclin1-положительные клетки) ассоциировано с интенсивной пигментацией увеальных меланом и опухолевой гипоксией [15]. Неблагоприятный прогноз течения болезни наблюдался у больных, у которых в опухоли выявляли либо гиперэкспрессию *Beclin1*, либо его полное отсутствие в более чем в 50% меланомных клетках. Однако метастазы у больных с гиперэкспрессией белка появлялись на более ранних сроках, чем при его отсутствии. Та же группа ученых получила аналогичные результаты при исследовании меланом кожи [15]. В других исследованиях только высокая степень экспрессии Beclin1 и LC3A ассоциировалась с агрессивностью и метастазированием меланом кожи [16]. Также по-

казано, что частота экспрессии *Beclin1* снижается от 100% в доброкачественных и 86,4% в диспластических невусах до 54,3% в меланомах и 26,7% в метастазах меланомы [17].

Таким образом, недавно открытый механизм аутофагии при злокачественных новообразованиях, в частности меланомах, плохо изучен *in vitro* и *in vivo*. Изучение механизмов этого процесса позволит не только разработать новые факторы для прогноза течения злокачественных новообразований и предсказания их лекарственной устойчивости, но и выявить новые мишени для противоопухолевой терапии. Изучение механизмов аутофагии является актуальной задачей, имеющей важное фундаментальное и практическое значение при создании новых терапевтических подходов к лечению больных меланомами на рациональной основе.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 12-04-33257 мол_а_вед.

ЛИТЕРАТУРА

1. Soengas M.S., Lowe S.W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*. 2003, v. 22 (20), p. 3138-3151.
2. Hocker T.L., Singh M.K., Tsao H. Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: moving from the benchside to the bedside. *J. Invest. Dermatol.* 2008, v. 128, p. 2575-2595.
3. Wan P.T., Garnett M.J., Roe S.M. et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004, v. 116, p. 855-867.
4. Eskelinen E. To be or not to be? Examples of incorrect identification of autophagic compartments in conventional transmission electron microscopy of mammalian cells. *Autophagy*. 2008, v. 4, p. 257-260.
5. Sheridan C., Brumatti G., Martin S.J. Oncogenic B-RafV600E inhibits apoptosis and promotes ERK-dependent inactivation of Bad and Bim. *J. Biol. Chem.* 2008, v. 283 (32), p. 22128-22135.
6. Corcelle E., Nebout M., Bekri S. et al. Disruption of autophagy at the maturation step by the carcinogen lindane is associated with the sustained mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity. *Cancer Res.* 2006, v. 66, p. 6861-6870.
7. Dong J., Phelps R.G., Qiao R. et al. BRAF oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation of human melanoma. *Cancer Res.* 2003, v. 63, p. 3883-3885.
8. Shintani T., Klionsky D.J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*. 2004, v. 306 (5698), p. 990-995.
9. Liang X.H., Yu J., Brown K., Levine B. Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function. *Cancer Res.* 2001, v. 61 (8), p. 3443-3449.
10. Maddodi N. et al. Induction of Autophagy and Inhibition of Melanoma Growth In Vitro and In Vivo by Hyperactivation of Oncogenic BRAF. *J. Invest. Dermatol.* 2010, v. 130 (6), p. 1657-1667.
11. Deng R., Li W., Guan Z. et al. Acetylcholinesterase expression mediated by c-Jun-NH2-terminal kinase pathway during anticancer drug-induced apoptosis. *Oncogene*. 2006, v. 25, p. 7070-7077.
12. Eich M., Roos W.P., Nikolova T., Kaina B. Contribution of ATM and ATR to the resistance of glioblastoma and malignant melanoma cells to the methylating anticancer drug temozolomide. *Mol. Cancer Ther.* 2013, Aug 19.
13. Armstrong J.L., Corazzari M., Martin S. et al. Oncogenic B-RAF signaling in melanoma impairs the therapeutic advantage of autophagy inhibition. *Clin. Cancer Res.* 2011, v. 17 (8), p. 2216-2226.
14. Sudipa June Chatterjee and Siyaram Pandey. Chemo-resistant melanoma sensitized by tamoxifen to low dose curcumin treatment through induction of apoptosis and autophagy. *Cancer Biology & Therapy*. 2011, v. 11, p. 2, 216-228.
15. Giatromanolaki A., Sivridis E., Bechrakis N.E. et al. Phosphorylated pVEGFR2/KDR receptor expression in uveal melanomas: relation with HIF2 α and survival. *Clin. Exp. Metastasis*. 2012, v. 29 (1), p. 11-17.
16. Han C., Sun B., Wang W. et al. Overexpression of microtubule-associated protein-1 light chain 3 is associated with melanoma metastasis and vasculogenic mimicry. *Tohoku J. Exp. Med.* 2011, v. 223 (4), p. 243-251.
17. Miracco C., Cosci E., Oliveri G. Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumors. *Int. Journ. of Oncology*. 2007, v. 30, p. 429-436.

Статья поступила 18.09.2013 г., принята к печати 30.07.2013 г.
Рекомендована к публикации А.А. Феденко

EFFECT OF *B-RAF*^{V600} ACTIVATING GENE MUTATIONS ON THE ABILITY OF MELANOMA CELLS TO AUTOPHAGY

Ryabaya O.O., Tsyganova I.V., Sidorova T.A., Burova O.S., Stepanova E.V.

FSBI N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center Of The Russian Academy Of Medical Sciences, Moscow

Key words: autophagy, melanoma, *B-RAF* gene mutations, chemoresistance

Background. We investigate the interaction of the *B-RAF* gene mutations status and levels of autophagy induction in melanoma cell lines *in vitro*.

Methods. In this report 12 human melanoma cell lines were investigated. *B-RAF* gene mutations were determined by PCR, expression of *Beclin1* mRNA – by RT-PCR. Analysis of the LC3B protein expression and accumulation, specifically associated with the membranes of autophagosomes, was performed by immunocytochemical assay.

Results. Among melanoma cell lines 7 had activating mutations in *B-RAF* gene. Basal expression level of *Beclin1* mRNA was identified in all melanoma cell lines. The basal expression ranged from 0,15 to 1,16 r.u. Cell lines starvation resulted in increased expression of mRNA *Beclin1* level in cells *B-RAF*^{wt}, but *B-RAF*^{V600} cell lines, it remained almost unchanged. Autophagy induction by temozolomide has shown a significant increase in the amount of autophagosome punctuate in *B-RAF*^{wt} and *B-RAF*^{V600} melanoma cells.

Conclusion. *B-RAF* mutations may affect the melanoma autophagy level *in vitro*. Investigation of the mechanisms of this process will enable the development of new predictive factors of drug resistance in melanoma and identify the original target for anticancer therapy.