

# Исследование взаимосвязи между циркадным ритмом и лекарственной устойчивостью на примере клеточных линий рака молочной железы

А.М. Оглоблина<sup>1</sup>, Е.Ю. Рыбалкина<sup>1</sup>, К.И. Кирсанов<sup>1</sup>, Н.И. Моисеева<sup>1</sup>, Р.В. Кондратов<sup>2</sup>, О.Ю. Сусова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;  
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>2</sup>Государственный университет Кливленда; 2121 Euclid Ave, Cleveland, OH, 44115, USA

Контакты: Ольга Юрьевна Сусова [susovaolga@gmail.com](mailto:susovaolga@gmail.com)

Белки циркадных ритмов контролируют транскрипцию около 10 % генов клетки, вызывая ритмичность экспрессии так называемых clock-контролируемых генов в течение цикла приблизительно в 24 ч. Эпидемиологические исследования подтверждают существование связи между нарушениями циркадных ритмов и развитием злокачественных опухолей, в том числе и рака молочной железы. Задачей настоящего исследования было на примере клеточных линий рака молочной железы человека MCF-7, ZR-75-1 и BT-474 определить, существуют ли различия в уровне экспрессии генов циркадного ритма в сравнении с линией условно нормальных эпителиальных клеток молочной железы MCF10A; а также выяснить, возможна ли корреляция между уровнем экспрессии циркадных генов в клетках рака молочной железы и их устойчивостью к противоопухолевым соединениям. В работе показано существенное снижение уровня экспрессии циркадного гена *Per1* в опухолевых линиях. Однако предположение о возможном влиянии *Per1* на устойчивость к противоопухолевым соединениям статистически не подтвердилось. Интересно, что при установлении фенотипа множественной лекарственной устойчивости в опухолевой клеточной сублинии MCF-7\_D отмечается повышение уровня экспрессии *Bmal1*, *Per1* и *Cry1*. Однако возможная связь между уровнем циркадных генов и устойчивостью к противоопухолевым соединениям не очевидна. Результаты этих пилотных экспериментов требуют дальнейших подтверждений.

**Ключевые слова:** циркадные ритмы, рак молочной железы, множественная лекарственная устойчивость, цитотоксичность, противоопухолевые препараты

DOI: 10.17650/2313-805X-2015-2-3-60-62

## Study of the relationship between circadian rhythms and drug resistance of breast tumor cell lines

A.M. Ogloblina<sup>1</sup>, E.Yu. Rybalkina<sup>1</sup>, K.I. Kirsanov<sup>1</sup>, N.I. Moiseeva<sup>1</sup>, R.V. Kondratov<sup>2</sup>, O.Yu. Susova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russia;

<sup>2</sup>Cleveland State University; 2121 Euclid Ave, Cleveland, OH, 44115, USA

10 % of genome mRNA expression is rhythmic and these 24-hrs rhythms are under control of the circadian clock. Epidemiologic studies have revealed a clear link between the disruption of circadian rhythms and cancer development in humans. Growing evidence shows that circadian disruption is associated with development of malignant tumors, including breast cancer. Aim of this study was to investigate: the expression of circadian clock genes in human mammary epithelial cell line MCF10A and breast cancer cell lines MCF-7, ZR-75-1, BT-474 and if the multidrug resistance phenotype of cancer cells is associated with changes in circadian clock genes expression. We have found that *Per1* expression significantly reduced in cancer cells. No correlation was detected between the expression of circadian clock genes and cancer breast cell lines drug resistance. Interestingly, the expression of *Bmal1*, *Per1* and *Cry1* were increased in multi-drug resistant MCF-7\_D cells compare with the parent cells MCF-7 cells, however, if these changes in the expression contribute to the drug-resistance or not is not clear. These results argue for further study.

**Key words:** circadian clock, breast cancer, multidrug resistance, cytotoxicity, anticancer drugs

### Введение

Молекулярная основа циркадных ритмов заключается в колебаниях транскрипции и трансляции циркадных генов. Белки циркадных ритмов контролируют транскрипцию около 10 % генов клетки, вызывая ритмичность экспрессии так называемых clock-контролируемых генов, большинство из которых тканеспецифичны [1, 2]. Нарушение экспрессии циркадных генов

изменяет не только ритмичность экспрессии clock-контролируемых генов, но и влияет на уровень их экспрессии [3]. Получены экспериментальные и эпидемиологические данные, подтверждающие, что нарушения в циркадных ритмах предрасполагают к появлению и развитию рака молочной железы (РМЖ), колоректального рака, рака матки и предстательной железы [4–10]. В ряде работ обсуждается роль белков циркад-

Значения  $IC_{50}$  для клеточных линий MCF-7, MCF10A и MCF-7\_D при воздействии химиопрепаратов

Клеточная линия	Паклитаксел, нМ	Цисплатин, мкМ	Доксорубицин, мкМ	Винбластин, нМ	5-Фторурацил, мкг/мл
MCF10A	2,0 ± 0,2	6,6 ± 0,5	0,030 ± 0,003	1,0 ± 0,1	2,00 ± 0,09
MCF-7	2,0 ± 0,13	6,8 ± 0,4	0,13 ± 0,08	8,0 ± 0,9	0,50 ± 0,04
MCF-7_D	70,0 ± 3,1	19,0 ± 1,2	2,500 ± 0,013	5,6 ± 0,3	2,50 ± 0,13

**Примечание.** Приведены данные типичного эксперимента.  $IC_{50}$  – концентрация полумаксимального ингибирования.

ного ритма как маркеров прогрессии опухоли и мишени противоопухолевой терапии [3, 11].

В настоящей работе предпринята попытка найти взаимосвязь между уровнем экспрессии циркадных генов и устойчивостью клеток РМЖ к воздействию противоопухолевых соединений.

### Материалы и методы

Для исследования были отобраны клеточные линии РМЖ человека: MCF-7, ZR-75-1, BT-474, которые сравнивались с условно нормальной линией MCF10A (нормальные эпителиальные клетки молочной железы; клетки получены от пациентки с фиброзно-кистозной болезнью) [12].

В целях выявления возможного участия циркадных генов в развитии резистентности к химиопрепаратам мы сопоставили экспрессию данных генов и чувствительность клеточных линий к токсическому действию противоопухолевых соединений, используемых при лечении РМЖ. Методом МТТ оценивали цитотоксичность следующих химиопрепаратов: паклитаксела (стабилизатор микротрубочек); винбластин (препарат, влияющий на денатурацию микротрубочек); цисплатина (алкилирующий агент); доксорубицина (антрациклиновый антибиотик) и 5-фторурацила (антиметаболит урацила).

Для всех клеточных линий исследовали уровень экспрессии циркадных генов *Bmal1*, *Clock1*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Для количественной оценки изменения уровня экспрессии был использован метод определения по пороговому циклу [13]. Нормализация образцов проводилась по отношению к количеству мРНК гена домашнего хозяйства *Rpl27* [14].

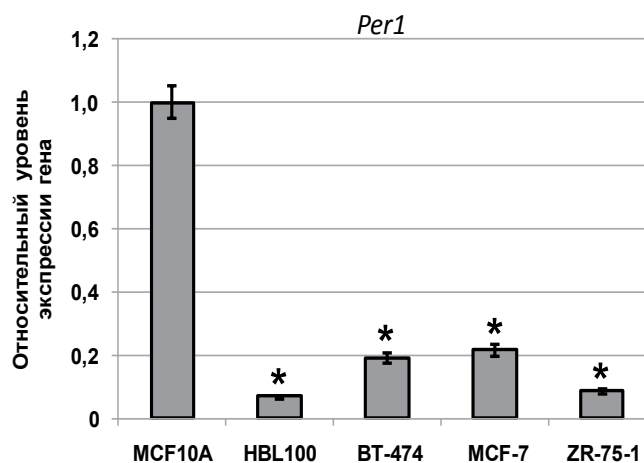
На следующем этапе работы получена устойчивая сублиния MCF-7\_D путем длительного культивирования клеток линии MCF-7 с высокими дозами доксорубицина. Клетки этой линии приобрели 20-кратную устойчивость к доксорубицину по сравнению с родительской линией MCF-7. Также они отличались перекрестной устойчивостью к паклитакселу, цисплатину, 5-фторурацилу (таблица). Можно заключить, что в полученных клетках наблюдается феномен множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Представлялось интересным сравнить экспрессию генов циркадного ритма в клетках линии MCF-7\_D и роди-

тельской линии MCF-7 и попытаться определить, существует ли взаимосвязь между уровнем экспрессии циркадных генов и установлением резистентности к препаратам.

### Результаты

Получены данные о снижении экспрессии *Per1* в опухолевых клеточных линиях по сравнению с контрольной MCF10A, что согласуется с данными литературы (рис. 1). Чувствительность клеток MCF10A к доксорубицину и винбластину была снижена по сравнению с клетками опухолевого происхождения. Мы проанализировали возможную связь между уровнем устойчивости клеточных линий к противоопухолевым соединениям и уровнем экспрессии гена *Per1*. Коэффициент корреляции Спирмена для доксорубицина составил  $r = -0,6$  ( $p = 0,35$ ); для цисплатина –  $r = 0,7$  ( $p = 0,23$ ); для паклитаксела –  $r = -0,89$  ( $p = 0,08$ ); для винбластина –  $r = -0,3$  ( $p = 0,68$ ); для 5-фторурацила –  $r = -0,2$  ( $p = 0,78$ ); т. е. мы не выявили статистически значимых корреляций.

**Цитотоксичность и уровень экспрессии циркадных генов в линиях MCF-7 и MCF-7\_D.** Нами отмечена тенденция к росту экспрессии генов *Bmal1*, *Per1* и *Cry1* в устойчивой линии MCF-7\_D по сравнению с клетками родительской линии MCF-7 (рис. 2). При этом наблюдалось повышение резистентности клеток к пакли-



**Рис. 1.** Относительные уровни экспрессии циркадного гена *Per1* в клеточных линиях РМЖ. \* – уровень экспрессии данного гена статистически значимо отличается от уровня экспрессии этого же гена в линии MCF10A ( $p \leq 0,05$ )

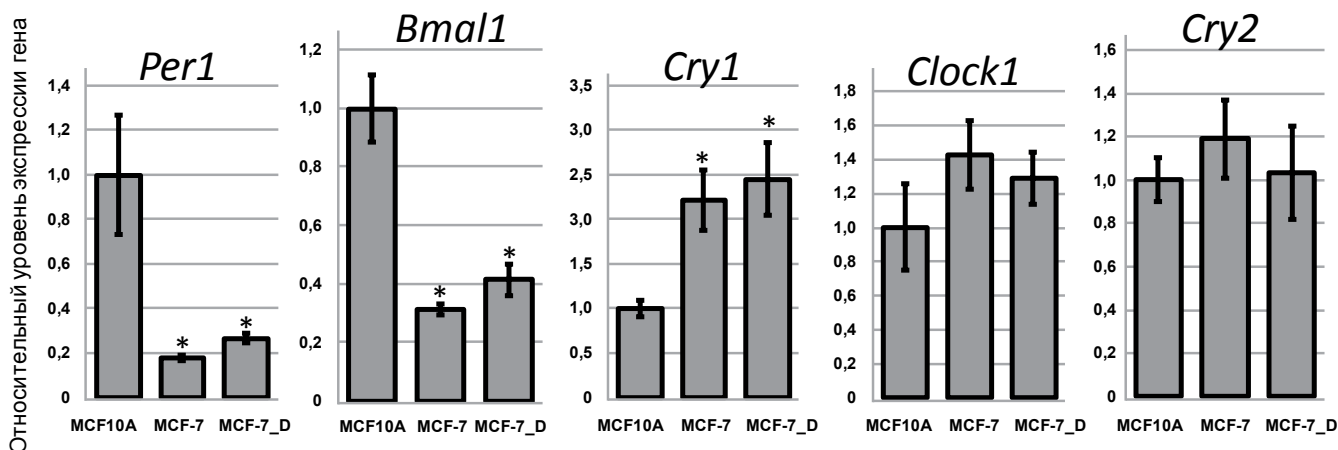


Рис. 2. Относительные уровни экспрессии циркадных генов в клеточных линиях MCF10A, MCF-7, MCF-7\_D. \* – уровень экспрессии данного гена статистически значимо отличается от уровня экспрессии этого же гена в линии MCF10A ( $p \leq 0,05$ )

такселу, цисплатину, доксорубицину и 5-фторурацилу, однако не отмечалось изменения устойчивости к винбластину.

### Заключение

Таким образом, резистентность клеток к винбластину, по-видимому, не связана с уровнем экспрессии циркадных генов в устойчивой сублинии MCF-7\_D.

Связь между МЛУ и экспрессией циркадных генов возможна в отношении устойчивости к доксорубицину, паклитакселу, 5-фторурацилу и цисплатину, но необходимы дополнительные экспериментальные подтверждения. В дальнейшем мы планируем сравнить уровень экспрессии генов-транспортеров в клетках линий MCF-7 и MCF-7\_D, чтобы понять, есть ли связь между МЛУ и уровнем экспрессии циркадных генов.

Авторы выражают огромную благодарность д.б.н. А.Ф. Карамышевой за полезную критику и помощь в оформлении рукописи.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 13-04-02187).

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kondratov R.V., Antoch M.P. The clock proteins, aging and tumorigenesis. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2007;72:477–82.
- Hughes M., Deharo L., Pulivarthy S.R. et al. High-resolution time course analysis of gene expression from pituitary. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2007;72:381–6.
- Igarashi T., Izumi H., Uchiumi T. et al. Clock and ATF transcription system regulates drug resistance in human cancer cell lines. Oncogene 2007;26(33):4749–60.
- Tynes T., Hannevik M., Andersen A. et al. Incidence of breast cancers in Norwegian female radio and telegraph operators. Cancer Causes Control 1996;7(2):197–204.
- Climent J., Perez-Losada J., Quigley D.A. et al. Deletion of the PER3 gene on chromosome 1p36 in recurrent ER-positive breast cancer. J Clin Oncol 2010;28(23):3770–8.
- Cao Q., Gery S., Dashti A. et al. A role for the clock gene per1 in prostate cancer. Cancer Res 2009;69(19):7619–25.
- Alhopuro P., Björklund M., Sammalkorpi H. et al. Mutations in the circadian gene CLOCK in colorectal cancer. Mol Cancer Res 2010;8(7):952–60.
- Conlon M., Lightfoot N., Kreiger N. Rotating shift work and risk of prostate cancer. Epidemiology 2007;18(1):182–3.
- Schernhammer E.S., Laden F., Speizer F.E. et al. Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses' health study. J Natl Cancer Inst 2003;95(11):825–8.
- Viswanathan A.N., Hankinson S.E., Schernhammer E.S. Night shift work and the risk of endometrial cancer. Cancer Res 2007;67(21):10618–22.
- Fang L., Yang Z., Zhou J. et al. Circadian clock gene CRY2 degradation is involved in chemoresistance of colorectal cancer. Mol Cancer Ther 2015;14(6):1476–87.
- Holliday D.L., Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. Breast Cancer Res 2011;13(4):215.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods 2001;25(4):402–8.
- De Jonge H.J., Fehrmann R.S., de Bont E.S. Evidence based selection of housekeeping genes. PLoS One 2007;2(9):e898.