

Неканоническая активность ретиноевой кислоты в отношении активации протеинкиназ в трансформированных клетках различного происхождения

А.Д. Еникеев, А.В. Комельков, И.Б. Зборовская, С.А. Галецкий, Г.О. Скрыбин, Е.М. Чевкина
НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Елена Максимовна Чевкина tchevkina@mail.ru

Введение. Неканоническая активность ретиноевой кислоты (РК) обнаружена сравнительно недавно и заключается в быстрой активации внутриклеточных сигнальных путей с помощью механизмов, не связанных с транскрипционной активностью ядерных рецепторов РК. Отдельные данные свидетельствуют о том, что неканоническая активность может стимулировать процессы малигнизации и участвовать в формировании резистентности опухолевых клеток к терапевтическому воздействию РК. Однако о механизмах неканонической активности известно достаточно мало. Непонятно, насколько этот эффект универсален, происходит ли РК-зависимая активация различных сигнальных протеинкиназ в одних и тех же клетках, и насколько активация этих киназ взаимосвязана.

Материалы и методы: культивирование клеток немелкоклеточного рака легкого и нейробластомы в стандартных условиях и при инкубации с полностью транс-ретиноевой кислотой (all-trans retinoic acid, ATRA); иммуноблоттинг.

Результаты. В работе исследовали влияние ATRA на активацию протеинкиназ Akt и Erk1/2 в зависимости от времени инкубации. Анализ выявил РК-зависимую активацию обеих киназ во всех исследуемых линиях клеток немелкоклеточного рака легкого и нейробластомы. Активация как Akt, так и Erk1/2 возникла при 5 мин инкубации, что соответствует нетранскрипционной (неканонической) активности РК, однако дальнейшая кинетика активации двух киназ существенно различалась.

Заключение. Мы показали, что ATRA вызывает краткосрочную активацию протеинкиназ Erk1/2 и Akt в клетках немелкоклеточного рака легкого и нейробластомы. Различия в кинетике РК-зависимой стимуляции двух киназ свидетельствуют о том, что их активация реализуется с помощью независимых механизмов.

Ключевые слова: ретиноевая кислота, неканоническая активность, протеинкиназа, фосфорилирование, Erk1/2, Akt

Для цитирования: Еникеев А.Д., Комельков А.В., Зборовская И.Б. и др. Неканоническая активность ретиноевой кислоты в отношении активации протеинкиназ в трансформированных клетках различного происхождения. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(4):127–30.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-127-130

Non-canonical activity of retinoic acid in relation to the activation of protein kinases in transformed cells of different origin

A.D. Enikeev, A.V. Komelkov, I.B. Zborovskaya, S.A. Galetsky, G.O. Skryabin, E.M. Tchevkina

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Background. The non-canonical activity of retinoic acid (RA) was discovered relatively recently and consists in the rapid activation of intracellular signaling pathways by the mechanisms not related to the transcriptional activity of the RA nuclear receptors. Separate data suggest that this activity can stimulate the processes of malignancy and contribute to the formation of tumor cell resistance to RA as a therapeutic agent. However, little is known about the mechanisms of this activity. It is also unclear how universal this effect is; does the RA-dependent activation of different signaling protein kinases occur in the same cells, and whether activation of these kinases is interrelated.

Materials and methods: cultivation of non-small cell lung cancer cells and neuroblastoma cells under standard conditions and with incubation with all-trans retinoic acid (ATRA); immunoblotting.

Results. Here we studied the effect of ATRA on the activation of Akt and Erk1/2 protein kinases depending on the incubation time. The analysis revealed RA-dependent activation of both kinases in all studied non-small cell lung cancer and neuroblastoma cell lines. Activation of Akt and Erk1/2 occurred at five minutes of incubation, which corresponds to the non-transcriptional (non-canonical) activity of the RA, however, further activation kinetics of the two kinases differed essentially.

Conclusion. We found that ATRA causes rapid activation of Erk1/2 and Akt protein kinases in both non-small cell lung cancer and neuroblastoma cells. The differences in the kinetics of RA-dependent stimulation of these two kinases suggest that their activation is mediated by independent mechanisms.

Key words: retinoic acid, non-canonical activity, protein kinase, phosphorylation, Erk1/2, Akt

For citation: Enikeev A.D., Komelkov A.V., Zborovskaya I.B. et al. Non-canonical activity of retinoic acid in relation to the activation of protein kinases in transformed cells of different origin. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2018;5(4):127–30.

Введение

Ретиноевая кислота (РК) регулирует множество системных процессов в организме, включая эмбриогенез, ремоделирование тканей, дифференцировку и различные аспекты функционирования иммунной системы. Каноническая функция РК опосредуется ее взаимодействием с ядерными рецепторами (RAR, RXR, PPAR), которые являются лигандактивируемыми транскрипционными факторами и регулируют экспрессию более 500 генов, в промоторе которых имеются ретиноид-респонсивные элементы (RARE). Многие гены-мишени РК стимулируют остановку клеточного цикла, дифференцировку и апоптоз, в связи с чем РК считается супрессором опухолевого роста.

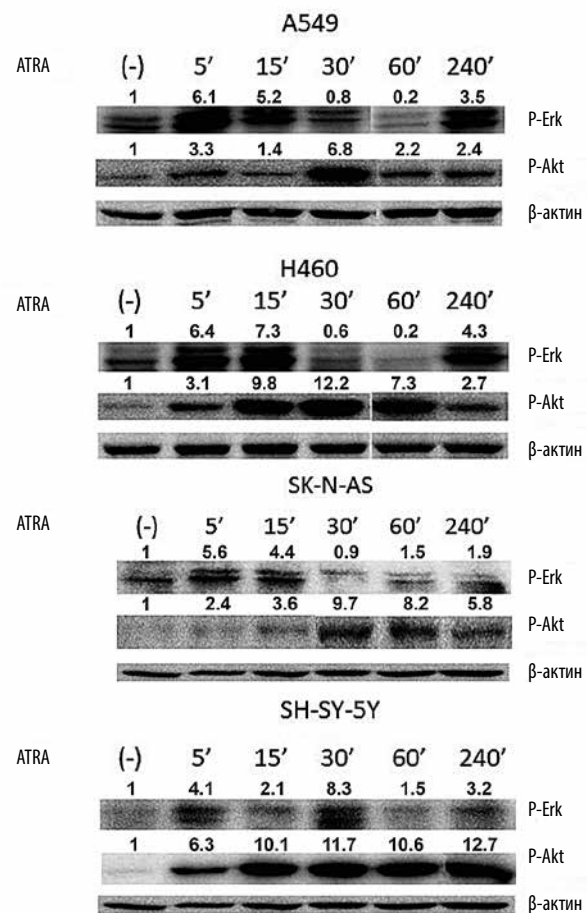
Наиболее активный изомер РК, полностью транс-ретиноевая кислота (all-trans retinoic acid, ATRA), успешно применяется в клинической практике для терапии острого промиелоцитарного лейкоза. Предпринимаются попытки использования РК в терапии и других типов онкопатологии [1–4]. Однако применение РК сильно ограничено за счет быстрого приобретения резистентности, а также вследствие большого количества побочных эффектов [3, 5]. Помимо основной функции недавно была обнаружена неканоническая, или так называемая негеномная, активность РК, которая не связана с активацией транскрипции, но приводит к быстрому лигандиндуцируемому изменению внутриклеточного сигналинга, включая активацию важнейших протеинкиназ, задействованных в канцерогенезе. Такой эффект РК показан в отношении MAP-киназ Erk1/2 [6–8] и p38 [9], а также антиапоптотической киназы Akt [10]. Также есть данные о том, что неканоническая активность усиливает злокачественный потенциал клеток и может являться одним из механизмов формирования устойчивости клеток к РК [11, 12]. В то же время нетранскрипционная РК-зависимая активация этих киназ может, наоборот, быть необходимым условием реализации канонической опухоль-супрессорной функции РК [13]. Исследования неканонической активности РК очень фрагментарны, а результаты, полученные только на нескольких типах клеток, противоречивы. Молекулярные механизмы неканонической активности мало изучены, более того, неизвестно, насколько универсальным является этот эффект.

Материалы и методы

Линии клеток и обработка ATRA. Клетки немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) (линии A549 и H460) и нейробластомы (линии SK-N-AS и SH-SY-5Y) культивировали в среде DMEM и RPMI соответственно с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки. Клетки высаживали в 60 мм чашки по 8×10^5 клеток на чашку. Через 24 ч меняли среду на бессывороточную на 18 ч (голодание), после чего меняли среду на полную с добавлением ATRA (Sigma, США) в концентрации 5 μM для клеток НМРЛ и 1 μM для клеток нейробластомы.

Клетки инкубировали в среде с ATRA в течение 5, 15, 30, 60 и 240 мин. Сразу после инкубации клетки промывали 2 раза PBS, снимали с подложки и осаждали центрифугированием 3600g в течение 6 мин.

Иммуноблоттинг. На 10 % гель для SDS-PAGE электрофореза наносили 20 мкг белка. Белки переносили на PVDF мембрану (Immobilon, Millipore), инкубировали в блокирующем растворе (5 % обезжиренное молоко (BioRad, США) или 5 % BSA (PAA Laborototies)), инкубировали 15 ч с антителами Anti-pAkt (S473) или Anti-pErk-1/2 (T202/Y204) (Cell Signalling), отмывали 3 раза в TBS с 0,1 % TWEEN-20, инкубировали 1,5 ч с вторичными антителами (Cell Signalling), проявляли с помощью реагента ECL (Millipore). Для нормализации количества нанесенного белка использовали антитела к β -актину (Abcam). Хемилюминесцентную



Анализ уровня фосфо-Erk1/2 (pThr202/Tyr204) и фосфо-AKT (pSer473) после обработки полностью транс-ретиноевой кислотой (all-trans retinoic acid, ATRA) клеток немелкоклеточного рака легкого и нейробластомы. Цифрами над треками обозначено изменение уровня фосфорилирования по сравнению с (-) контролем – клетками в отсутствие обработки ATRA – по результатам денситометрического анализа с нормализацией по референсному белку (β -актину)

Analysis of phospho-Erk1/2 (pThr202/Tyr204) and phospho-AKT (pSer473) levels after treatment with all-trans retinoic acid (ATRA) of non-small-cell lung cancer and neuroblastoma cells. Numbers above tracks denote changes in phosphorylation levels compared to (-) control – cells untreated with ATRA – per the results of densitometry analysis with normalization by reference protein (β -actin)

реакцию регистрировали на приборе Kodak GelLogic 2200 Imaging system с последующей обработкой с помощью программы Kodak Molecular Imaging Software SE v. 5.0.1.27.

Результаты и обсуждение

По данным литературы, РК-зависимая стимуляция протеинкиназ может происходить в период первых 5–60 мин инкубации, что соответствует фосфорилированию имеющегося пула белков (неканоническая, или негеномная, активность РК), в то время как более длительная обработка РК приводит к изменениям количества и активности белков за счет транскрипционной активности рецепторов РК (каноническая активность). Мы провели анализ влияния АТРА на активность протеинкиназ Erk1/2 и Akt в клетках НМРЛ и нейробластомы в зависимости от времени инкубации. Уровень активации протеинкиназ определяли с помощью анализа статуса активирующего фосфорилирования – по сайтам T202/Y204 для Erk1/2 и остатку серина S473 для Akt.

Анализ выявил РК-зависимую активацию обеих киназ во всех исследуемых линиях, однако кинетика этого процесса существенно различалась (см. рисунок). Для Erk1/2 обнаружено 2 четких пика фосфорилирования во всех исследуемых клетках. Первый пик соответствовал 5–15 мин обработки АТРА (в случае клеток SH-SY-5Y – 5–30 мин), второй регистрировался после 4 ч инкубации. Интересно, что в промежуточном периоде (час обработки) наблюдалось снижение активирующего фосфорилирования Erk1/2 до уровня ниже контрольного (без инкубации). Такие пики фосфорилирования соответствуют негеномной кратковременной активации и долговременной транскрипционной активации Erk1/2, а их разграничение во времени отражает, по-видимому, тот факт, что эти процессы напрямую не связаны между собой, т. е. происходят независимо.

Активация Akt также наблюдалась начиная с 5 мин, достигая максимума в зависимости от типа клеток к 30–60 мин инкубации с АТРА, однако в отличие от Erk1/2 ни в одной из исследованных линий не наблюдалось снижения фосфорилирования Akt до контрольного уровня. Такая кинетика фосфорилирования свидетельствует о том, что процессы РК-зависимой неканонической и транскрипционной активации Akt не разделены во времени. Возможно, что это сопряженные процессы, как было показано для РК-зависимой активации киназы p38. Так, не-транскрипционная РК-зависимая активация p38 является, по-видимому, необходимым условием транскрипционной активности рецепторов RAR и реализации канонической активности РК [9, 13]. Несмотря на то что Erk1/2- и Akt-ассоциированные сигнальные пути могут иметь пересечения, обнаруженная нами различная кинетика РК-зависимой активации данных киназ свидетельствует о разных механизмах, опосредующих неканоническую активность РК в отношении данных мишеней.

Заключение

Мы показали, что АТРА вызывает краткосрочную активацию ключевых регуляторов малигнизации клеток и опухолевой прогрессии, протеинкиназ Erk1/2 и Akt. Эффект неканонической активности РК, по-видимому, универсален, поскольку обнаруживается в клетках НМРЛ и нейробластомы. Различная кинетика РК-зависимого фосфорилирования данных киназ указывает на то, что их активация происходит с помощью различных сигнальных путей. Дальнейшее исследование молекулярных механизмов неканонической активности РК будет способствовать разработке подходов к преодолению резистентности к РК и побочных эффектов ее применения в терапии злокачественных опухолей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bushue N., Wan Y.J.Y. Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62(13):1285–98. DOI: 10.1016/j.addr.2010.07.003. PMID: 20654663.
- Connolly R.M., Nguyen N.K., Sukumar S. Molecular pathways: current role and future directions of the retinoic acid pathway in cancer prevention and treatment. *Clin Cancer Res* 2013;19(7):1651–9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3175. PMID: 23322901.
- Garattini E., Gianni M., Terao M. Retinoids as differentiating agents in oncology: a network of interactions with intracellular pathways as the basis for rational therapeutic combinations. *Curr Pharm Des* 2007;13(13):1375–400. PMID: 17506722. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17506722>.
- Soprano D.R., Qin P., Soprano K.J. Retinoic acid receptors and cancers. *Annu Rev Nutr* 2004;24:201–21. DOI: 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132407. PMID: 15189119.
- Freemantle S.J., Spinella M.J., Dmitrovsky E. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene* 2003;22(47):7305–15. DOI: 10.1038/sj.onc.1206936. PMID: 14576840.
- Persaud S.D., Lin Y.W., Wu C.Y. et al. Cellular retinoic acid binding protein I mediates rapid non-canonical activation of Erk1/2 by all-trans retinoic acid. *Cell Signal* 2013;25(1):19–25. DOI: 10.1016/j.celsig.2012.09.002. PMID: 22982089.
- Persaud S.D., Park S.W., Ishigami-Yuasa M. et al. All trans-retinoic acid analogs promote cancer cell apoptosis through non-genomic Crabp1 mediating Erk1/2 phosphorylation. *Sci Rep* 2016;6:22396. DOI: 10.1038/srep22396. PMID: 26935534.
- Quintero Barceinas R.S., Garcia-Regalado A., Aréchaga-Ocampo E. et al. All-trans retinoic acid induces proliferation, survival, and migration in A549 lung cancer cells by activating the Erk signaling pathway through a transcription-independent mechanism. *Biomed Res Int* 2015;2015:404368.

- DOI: 10.1155/2015/404368.
PMID: 26557664.
9. Alsayed Y., Uddin S., Mahmud N. et al. Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to all-trans-retinoic acid. *J Biol Chem* 2001;276(6):4012–9. DOI: 10.1074/jbc.M007431200. PMID: 11060298.
10. Masia S., Alvarez S., de Lera A.R. et al. Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. *Mol Endocrinol* 2007;21(10):2391–402. DOI: 10.1210/me.2007-0062. PMID: 17595318.
11. Piskunov A., Rochette-Egly C. A retinoic acid receptor RAR α pool present in membrane lipid rafts forms complexes with G protein α Q to activate p38MAPK. *Oncogene* 2012;31(28):3333–45. DOI: 10.1038/onc.2011.499. PMID: 22056876.
12. García-Regalado A., Vargas M., García-Carrancá A. et al. Activation of Akt pathway by transcription-independent mechanisms of retinoic acid promotes survival and invasion in lung cancer cells. *Mol Cancer* 2013;12:44. DOI: 10.1186/1476-4598-12-44. PMID: 23693014.
13. Bruck N., Vitoux D., Ferry C. et al. A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RAR α to target promoters. *EMBO J* 2009;28(1):34–47. DOI: 10.1038/emboj.2008.256. PMID: 19078967.

Вклад авторов

А.Д. Еникеев: получение данных, анализ;
А.В. Комельков: статистический анализ;
И.Б. Зборовская: обзор публикаций по теме статьи;
С.А. Галецкий, Г.О. Скрябин: получение данных;
Е.М. Чевкина: разработка дизайна исследования, написание текста статьи.

Authors' contributions

A.D. Enikeev: obtaining data, analysis;
A.V. Komelkov: statistical analysis;
I.B. Zborovskaya: reviewing of publications of the article's theme;
S.A. Galetsky, G.O. Skryabin: obtaining data;
E.M. Tchekina: developing the research design, article editing.

ORCID авторов/ORCID of authors

А.Д. Еникеев/A.D. Enikeev: <https://orcid.org/0000-0002-7628-8616>
А.В. Комельков/A.V. Komelkov: <https://orcid.org/0000-0003-0766-163X>
И.Б. Зборовская/I.B. Zborovskaya: <https://orcid.org/0000-0001-7142-3316>
С.А. Галецкий/S.A. Galetsky: <https://orcid.org/0000-0002-6953-5244>
Г.О. Скрябин/G.O. Skryabin: <https://orcid.org/0000-0002-4127-6973>
Е.М. Чевкина/E.M. Tchekina: <https://orcid.org/0000-0001-8837-7969>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 16-04-01 559А.

Financing. The study was performed by the grant from the Russian Foundation for Basic Research No. 16-04-01 559A.

Статья поступила: 18.10.2018. **Принята к публикации:** 31.10.2018.

Article received: 18.10.2018. **Accepted for publication:** 31.10.2018.