

Влияние экспрессии CRABP1 на пролиферацию и чувствительность к ретиноевой кислоте клеток рака молочной железы различного происхождения

А.Д. Еникеев, А.В. Комельков, М.Е. Аксельрод, С.А. Галецкий, Е.М. Чевкина

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Андрей Викторович Комельков kotelkov@gmail.com

Введение. Ретиноевая кислота (РК) за счет модуляции транскрипции ряда ретиноид-респонсивных генов участвует в регуляции процессов дифференцировки и пролиферации. Механизмы действия белков-шаперонов, связывающих РК, CRABP1 и CRABP2 (Cellular Retinoic Acid Proteins-1 и -2), в реализации активности РК, а также их участие в опухолевой прогрессии до сих пор полностью неясны. Последние данные свидетельствуют о том, что функциональные различия между белками CRABP в отношении малигнизации клеток рака молочной железы (РМЖ) могут быть связаны с чувствительностью опухолевых клеток к РК и с разным рецепторным статусом опухоли.

Материалы и методы. Кодировочную последовательность CRABP1 гиперэкспрессировали в клетках РМЖ с отсутствием эндогенной экспрессии данного белка, разным уровнем РК-чувствительности и рецепторным статусом — линии SKBR3 (РК-чувствительные, ER(-)/HER2(+)) и MDA-MB-231 (РК-резистентные, трижды негативный статус). Оценивали рост производных CRABP1(+)- и контрольных сублиний клеток в стандартных условиях культивирования и в присутствии различных концентраций РК.

Результаты. Исследовано влияние экспрессии CRABP1 в чувствительных и резистентных к РК клетках РМЖ с различным рецепторным статусом на динамику пролиферации и чувствительность клеток к РК. Показано, что экспрессия CRABP1 в чувствительных к РК клетках SKBR3 стимулирует пролиферацию клеток в отсутствие РК и снижает антипролиферативный эффект РК, в то время как в резистентных клетках MDA-MB-231 экспрессия CRABP1 не влияет на исследуемые характеристики.

Заключение. CRABP1 стимулирует пролиферативную активность и снижает чувствительность к РК HER2(+)-клеток РМЖ, но не оказывает аналогичного действия на высокоагрессивные трижды негативные клетки, резистентные к действию РК.

Ключевые слова: ретиноевая кислота, ATRA, CRABP1, пролиферация, рак молочной железы

Для цитирования: Еникеев А.Д., Комельков А.В., Аксельрод М.Е. и др. Влияние экспрессии CRABP1 на пролиферацию и чувствительность к ретиноевой кислоте клеток рака молочной железы различного происхождения. *Успехи молекулярной онкологии* 2020;7(4):46–50.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-4-46-50



Effect of CRABP1 expression on the proliferation and the sensitivity to retinoic acid of breast cancer cells of different origin

A.D. Enikeev, A.V. Komelkov, M.E. Axelrod, S.A. Galetsky, E.M. Tchekina

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

Background. Retinoic acid (RA), by modulation of the transcription of a number of retinoid-responsive genes, is involved in the regulation of cell differentiation and proliferation. The mechanisms by which the RA-binding proteins, molecular chaperones CRABP1 and CRABP2 (Cellular Retinoic Acid Proteins-1 and -2), participate in the realization of RA activity, as well as their precise role in tumor progression are still not fully understood. Recent data indicate that functional differences of CRABP proteins with respect to malignization of breast cancer cells could be determined by different sensitivity of tumor cells to RA and with the receptor status of the tumor.

Materials and methods. The CRABP1 coding sequence was overexpressed in breast cancer cells without endogenous expression of this protein, with different levels of RA sensitivity and receptor status — SKBR3 (RA-sensitive, ER(-)/HER2(+)) cells and MDA-MB-231 (RA-resistant, triple negative status). The growth of CRABP1(+) derivatives and control cells was evaluated under standard culture conditions and in the presence of various concentrations of RA.

Results. The effect of CRABP1 expression in RA-sensitive and RA-resistant breast cancer cells with different receptor status on the growth rate and sensitivity of cells to RA was studied. The expression of CRABP1 in RA-sensitive SKBR3 cells enhances proliferation in the absence of RA and decreases the antiproliferative effect of RA, while in RA-resistant triple-negative MDA-MB-231 cells, the expression of CRABP1 does not affect the studied characteristics.

Conclusion. CRABP1 stimulates growth and suppresses the RA-sensitivity of HER2(+) RA-sensitive cells, but does not have a similar effect on highly aggressive triple-negative RA-resistant cells.

Key words: retinoic acid, ATRA, CRABP1, proliferation, breast cancer

For citation: Enikeev A. D., Komelkov A. V., Axelrod M. E. et al. Effect of CRABP1 expression on the proliferation and the sensitivity to retinoic acid of breast cancer cells of different origin. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2020;7(4):46–50. (In Russ.).

Введение

К природным ретиноидам относят различные изомеры ретиноевой кислоты (РК), включая наиболее активную и представленную в клетке форму – полностью трансретиноевую кислоту (All Trans Retinoic Acid, ATRA). Природные и синтетические ретиноиды – перспективные противоопухолевые соединения, некоторые из которых с разной степенью успешности применяются при терапии злокачественных опухолей [1, 2]. Основной функцией РК является транскрипционная регуляция РК-респонсивных генов посредством активации транскрипционных факторов – рецепторов РК RAR/RXR – в ядре, куда ее доставляют представители семейства липидсвязывающих белков, прежде всего белки CRABP [3, 4]. Несмотря на высокую гомологию, белки CRABP1 и CRABP2 выполняют, по-видимому, различную роль [5, 6], однако точное значение этих белков, особенно CRABP1, как в отношении проведения ретиноевого сигналинга, так и в контексте опухолевой прогрессии до сих пор мало понятно. Противоречивые результаты по этому вопросу связаны, по-видимому, с различиями в происхождении и молекулярно-генетических характеристиках клеток, а также с разными экспериментальными моделями. Данные последних лет свидетельствуют о том, что белки CRABP могут оказывать различное и даже противоположное действие на клетки рака молочной железы (PMЖ) в зависимости от их рецепторного статуса. Так, экспрессия CRABP1, в отличие от CRABP2, в ER(–), но не в ER(+)-клетках PMЖ ассоциирована с высокой степенью злокачественности опухолей и меньшей выживаемостью пациентов. Согласно данным другой работы экспрессия CRABP2 в ER(–)-клетках стимулирует их инвазивную и метастатическую активность, в то время как в ER(+)-клетках экспрессия этого белка оказывает противоположный эффект.

Влияние CRABP1 на уровень злокачественности клеток PMЖ с различным рецепторным статусом ранее не исследовалось. Также ранее не изучалось влияние этого белка на чувствительность клеток PMЖ к РК.

В данной работе мы исследовали эффект экзогенной экспрессии CRABP1 в отношении указанных характеристик в клетках PMЖ, характеризующихся, с одной стороны, отсутствием эндогенной экспрессии данного белка, с другой – обладающих разными статусами ER и разными исходными уровнями чувствительности к РК. Ранее при исследовании чувствительности к РК 10 клеточных линий PMЖ мы не обнаружили ER(+)-клеток с отсутствием продукции CRABP1, поэтому в качестве модели были выбраны клетки ER(–)/HER2(+) и клетки линии трижды негативного PMЖ.

Материалы и методы

Линии клеток и обработка ATRA. Клетки PMЖ SKBR3 и MDA-MB-231 культивировали в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. При культивировании линии MDA-MB-231 6×10^4 клеток высаживали в 60-миллиметровые чашки, для линии SKBR3 использовали 30-миллиметровые чашки и высаживали по 15×10^4 клеток. Через 24 ч меняли стандартную среду на среду с добавлением ATRA (Sigma, США) в концентрации 10, 50 и 100 мкМ при использовании линии MDA-MB-231 и 0,01, 0,1 и 1 мкМ при использовании линии SKBR3. После 120 ч культивирования (в стандартных условиях и в присутствии ATRA) оценивали количество живых клеток (при смешивании суспензии клеток с трипановым синим в соотношении 1:1) методом прямого подсчета в камере Горяева.

Получение клеток с гиперэкспрессией CRABP1. Для получения клеток с гиперэкспрессией CRABP1 использовали ретровирусный вектор pLXSN со встроенной кодирующей последовательностью [7]. Трансдукцию проводили методом ретровирусной инфекции по описанной ранее методике [7]. Псевдоретровирусные частицы собирали в течение 3 дней и добавляли к клеткам в количестве 2×10^4 (MDA-MB-231) и 15×10^4 (SKBR3). Селекцию проводили на генетине в концентрации 1000 мг/мл (MDA-MB-231) и 500 мг/мл (SKBR3) в течение 7–10 дней.

Иммуноблоттинг. Клетки лизировали в буфере RIPA, содержащем ингибиторы протеаз и фосфатаз. Для проведения электрофореза в 10 % полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия (SDS-PAGE), использовали 15 мкг белка. Анализ выполняли по описанной ранее методике [7] с использованием антител к CRABP1 (Sigma, США) и β -актину (Abcam).

Статистический анализ. Результаты 3 независимых повторов представлены в виде среднего арифметического с указанием стандартного отклонения ($M \pm SD$). Различия показателей считали статистически значимым при $p < 0,05$. Сравнение 2 групп проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни, для сравнения 3 и более групп применяли двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с пост-тестом Тьюки для попарных сравнений. Все расчеты выполняли и графики строили с использованием программы GraphPad 8.3 (GraphPad Software, США).

Результаты

Ранее мы показали, что клетки PMЖ отличаются большой вариабельностью в отношении чувствительности к РК [8]. Среди исследованных клеточных линий оказались как резистентные и высокочувствительные

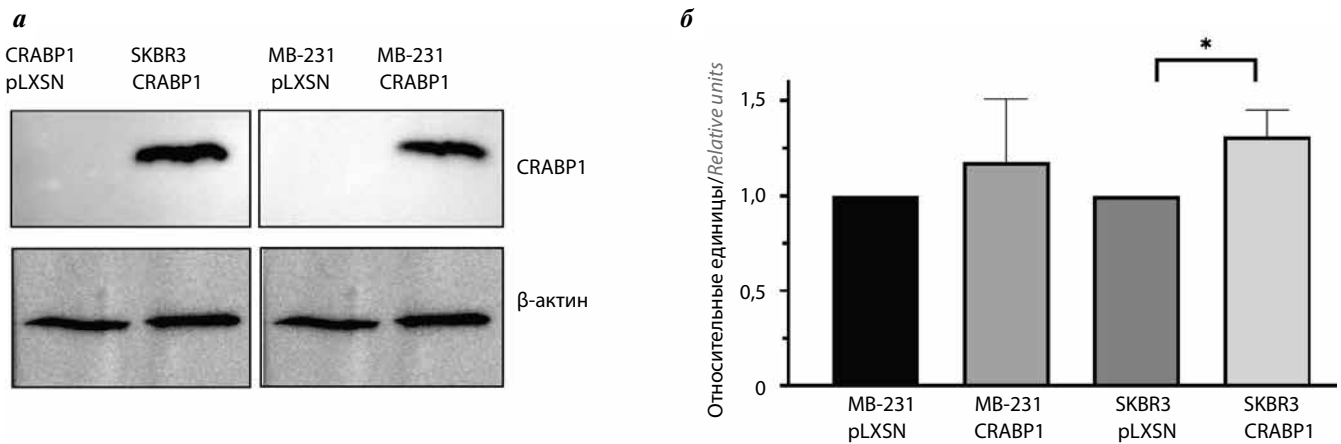


Рис. 1. Влияние экспрессии *CRABP1* на пролиферацию клеток рака молочной железы в культуре: а — анализ белка *CRABP1* в производных клетках *SKBR3* и *MDA-MB-231* с экзогенной экспрессией *CRABP1* и контрольных клетках; б — сравнение пролиферации клеток *SKBR3* и *MDA-MB-231* с гиперэкспрессией *CRABP1* и контрольных клеток. Статистическую значимость различий в количестве живых клеток по результатам 3 независимых экспериментов рассчитывали с помощью критерия Манна–Уитни отдельно для линий клеток *MDA-MB-231* и *SKBR3*, сравнение проводили для каждой пары клеточных сублиний (контроль («пустой» вектор) vs клетки *CRABP1*(+)). Для наглядности сравнения пролиферации *CRABP1*-зависимых изменений в разных линиях рака молочной железы на графике представлены относительные значения изменения пролиферации, за единицу в каждом случае принята пролиферация контрольной сублинии с экспрессией «пустого» вектора. *Статистическая достоверность различий между группами

Fig. 1. Effect of *CRABP1* expression on breast cancer cells growth in culture: a — analysis of *CRABP1* protein in *SKBR3* and *MDA-MB-231* derivative cells with exogenous expression of *CRABP1* and corresponding control cells; б — proliferation of *SKBR3* and *MDA-MB-231* cells with hyperexpression of *CRABP1* in comparison with control cells. The statistical significance of the differences in the number of living cells according to the results of three independent experiments was calculated using the Mann–Whitney test separately for the cell lines *MDA-MB-231* and *SKBR3*, the comparison was carried out for each pair of derivative sublines (control (“empty” vector) vs *CRABP1* cells(+)). For clarity of comparison of the proliferation of *CRABP1*-dependent changes in two breast cancer lines, the graph shows the relative values of the change in proliferation, the unit in each case is the proliferation of the control cells expressing the “empty” vector. *Statistical significance of the group differences

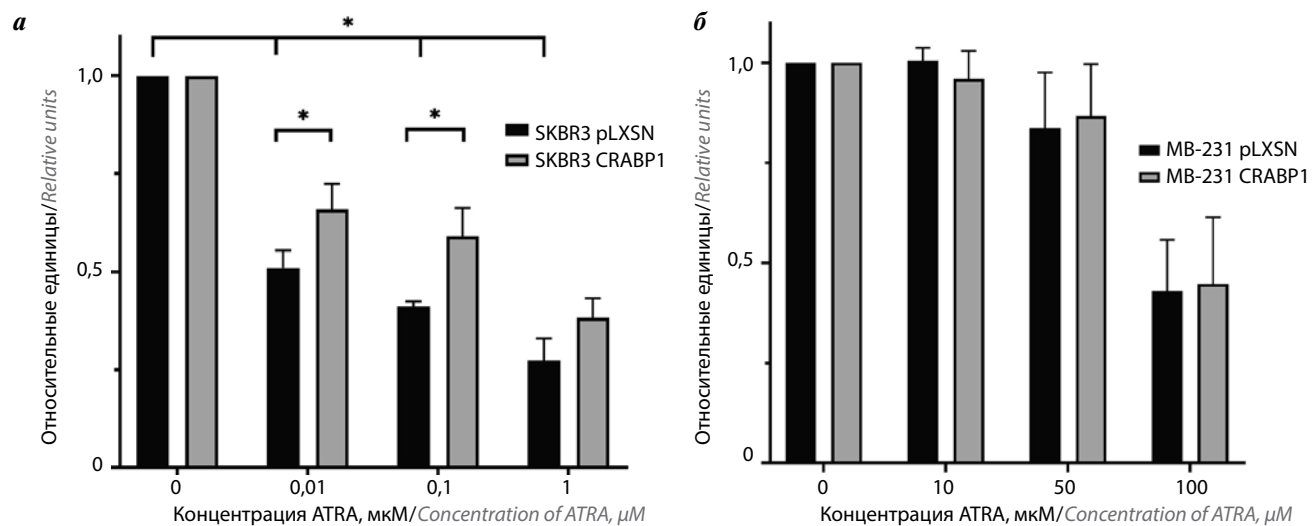


Рис. 2. Сравнение пролиферации клеток *SKBR3* (а) и *MDA-MB-231* (б) с гиперэкспрессией *CRABP1* или «пустого» вектора при инкубации с *ATRA* в различных концентрациях. Статистическую значимость различий в количестве живых клеток по результатам 3 независимых экспериментов для каждой концентрации *ATRA* рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с дальнейшим посттестом Тьюки для проведения попарных сравнений. Для наглядности на графике представлены относительные значения изменения пролиферации, за единицу в каждом случае принята пролиферация каждой из полученных сублиний при нулевой концентрации *ATRA*. *Статистическая достоверность различий между группами

Fig. 2. Comparison of proliferation of *SKBR3* (a) and *MDA-MB-231* (b) cells overexpressing *CRABP1* or “empty” vector in the presence of different concentrations of *ATRA*. The statistical significance of differences in the number of living cells according to the results of three independent experiments for each concentration of *ATRA* were calculated using two-way ANOVA followed by Tukey’s post-test for pairwise comparisons. For clarity the graph represents the relative values of the change in proliferation, normalized in each case using the value of proliferation of each derivative subline (expressing *CRABP1* or “empty” vector) without *ATRA* treatment. *Statistical significance of the group differences

к РК, так и линии с промежуточным уровнем чувствительности. Столь же различной оказалась и экспрессия *CRABP1* в этих линиях, варьируя от полного отсутствия до высокого уровня продукции белков. Для ана-

лиза были выбраны клетки РМЖ с отсутствием эндогенной экспрессии *CRABP1*, характеризующиеся разной чувствительностью к РК и разным рецепторным статусом — *SKBR3* (ПК-чувствительные, ER(-)/HER2(+))

и MDA-MB-231 (РК-резистентные клетки трижды негативного РМЖ). Анализ экзогенной экспрессии (рис. 1а) показал высокий уровень продукции CRABP1 в полученных производных обеих линий по сравнению с контрольными клетками.

Сравнение количества живых клеток в стандартных условиях культивирования показало, что экспрессия CRABP1 значительно стимулирует динамику пролиферации клеток SKBR3, но не влияет на пролиферацию клеток MDA-MB-231 (рис. 1б).

При инкубации с ATRA контрольные клетки SKBR3 рLXSN подтвердили показанную ранее чувствительность к РК – значимое снижение пролиферации наблюдалось уже при минимальной концентрации ATRA, равной 0,01 мкМ (рис. 2а). Экзогенная экспрессия CRABP1 в этих клетках снизила эффект РК: CRABP1(+)-клетки продемонстрировали лучшую динамику пролиферации, т. е. количество живых клеток было значительно выше в линиях, экспрессирую-

щих CRABP1 по сравнению с контролем. При высокой (для чувствительных клеток) концентрации ATRA (1 мкМ и больше) различия теряли статистическую значимость по причине массовой гибели как CRABP1(+), так и контрольных клеток.

Экспрессия CRABP1 в линии MDA-MB-231 не влияла на рост клеток в присутствии ATRA (рис. 2б). Полученные результаты согласуются с данными наших предыдущих исследований об опухолепротормотной роли CRABP1 в ряде злокачественных опухолей [7, 9], а также с данными исследований о связи этого белка с плохим прогнозом при РМЖ [10].

Заключение

Впервые показано, что белок CRABP1 стимулирует пролиферацию чувствительных к РК клеток РМЖ и снижает их чувствительность к действию РК, но не влияет на эти характеристики в резистентных к РК клетках с трижды негативным рецепторным статусом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Schenk T, Stengel S., Zelent A. Unlocking the potential of retinoic acid in anticancer therapy. *Bf J Cancer* 2014;111(11):2039–45. DOI: 10.1038/bjc.2014.412.
2. 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):1651–959. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3175.
3. Vreeland A.C., Levi L., Zhang W. et al. Cellular retinoic acid-binding protein 2 inhibits tumor growth by two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 2013;289(49):34065–73. DOI: 10.1074/jbc.M114.604041.
4. Dong D., Ruuska S.E., Levinthal D.J., Noy N. Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. *J Biol Chem* 1999;274(34):23695–8. DOI: 10.1074/jbc.274.34.23695.
5. 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. [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. *Uspekhii molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):127–30. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2313-805x-2018-5-4-127-130.
6. Tchevkina E.M. Retinoic acid binding proteins and cancer: similarity or polarity? *Cancer Ther Oncol Int J* 2017;8(2):555733. DOI: 10.19080/ctoj.2017.08.555733.
7. Kainov Y., Favorskaya I., Delektorskaya V. et al. CRABP1 provides high malignancy of transformed mesenchymal cells and contributes to the pathogenesis of mesenchymal and neuroendocrine tumors. *Cell Cycle* 2014;13(10):1530–39. DOI: 10.4161/cc.28475.
8. Еникеев А.Д., Комельков А.В., Аксельрод М.Е. и др. Влияние экспрессии CRABP1 на рост и чувствительность к ретиноевой кислоте клеток РМЖ различного происхождения. *Биохимия* 2020. В печати. [Enikeev A.D., Komelkov A.V., Axelrod M.E. et al. CRABP1 and CRABP2 protein levels do not correlate with the sensitivity of breast cancer cells to retinoic acid, but correlate with each other, with CRABP2 being an upstream regulator of CRABP1 production. *Biochemistry* 2020. In press. (In Russ.)].
9. Favorskaya I., Kainov Y., Chemeris G. et al. Expression and clinical significance of CRABP1 and CRABP2 in non-small cell lung cancer. *Tumor Biol* 2014;35(10):10295–300. DOI: 10.1007/s13277-014-2348-4.
10. Liu R.Z., Garcia E., Glubrecht D.D. et al. CRABP1 is associated with a poor prognosis in breast cancer: adding to the complexity of breast cancer cell response to retinoic acid. *Mol Cancer* 2015;14(1):129. DOI: 10.1186/s12943-015-0380-7.

Вклад авторов

А.Д. Еникеев: получение данных, анализ полученных данных;
 А.В. Комельков: статистический анализ;
 М.Е. Аксельрод: обзор публикаций по теме статьи;
 С.А. Галецкий: получение данных;
 Е.М. Чевкина: разработка дизайна исследования, написание текста статьи.

Authors' contributions

A.D. Enikeev: obtaining data, analysis;
A.V. Komelkov: statistical analysis;
M.E. Axelrod: reviewing of publications of the article's theme;
S.A. Galetsky: obtaining data;
E.M. Tchevkina: 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>
М.Е. Аксельрод / M.E. Axelrod: <https://orcid.org/0000-0003-2778-7870>
С.А. Галецкий / S.A. Galetsky: <https://orcid.org/0000-0003-0350-8056>
Е.М. Чевкина / E.M. Tchevkina: <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. Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-015-00027А).

Financing. The study was performed with the support of the Russian Foundation for Basic Research (project No. 19-015-00027A).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

This article does not describe any research involving humans or animals as subjects.