

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-112-116



# Сигнальный путь микроРНК-484/Akt в регуляции чувствительности клеток рака молочной железы к противоопухолевым препаратам

О.Е. Андреева, Д.В. Сорокин, А.М. Щербаков, Ю.Ю. Щеголев, М.В. Гудкова, М.А. Красильников

Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24

**Контакты:** Михаил Александрович Красильников [krasilnikovm1@yandex.ru](mailto:krasilnikovm1@yandex.ru)

Развитие приобретенной резистентности злокачественных опухолей к препаратам направленного действия, таким как таргетные и гормональные препараты, сопряжено с перестройкой внутриклеточной сигнальной сети и активацией незаблокированных путей передачи ростового сигнала. Непосредственное участие в развитии и поддержании подобных изменений принимают эпигенетические регуляторы, в частности некодирующие микроРНК, контролирующие уровень экспрессии конкретных сигнальных белков. Ранее мы показали, что развитие резистентности клеток рака молочной железы к ингибиторам mTOR (mammalian target of rapamycin) и блокаторам эстрогенового сигналинга сопровождается конститутивной активацией протеинкиназы Akt – основного антиапоптотического белка клеток. **Цель настоящей работы** – исследование роли отдельных микроРНК в регуляции экспрессии Akt и формировании резистентного фенотипа клеток рака молочной железы.

Мы показали, что повышение активности протеинкиназы Akt в сублиниях MCF-7, резистентных к тамоксифену или рапамицину, ассоциировано со снижением уровня микроРНК-484 – одного из супрессоров Akt. Трансфекция в клетки MCF-7 микроРНК-484 не влияет на активность эстрогенового сигналинга, но приводит к выраженному снижению экспрессии Akt и сопровождается повышением чувствительности клеток к тамоксифену и рапамицину. Полученные данные свидетельствуют об участии сигнального пути микроРНК-484/Akt в сенсбилизации клеток рака молочной железы к действию таргетных и гормональных препаратов, что позволяет рассматривать микроРНК-484 в качестве перспективного кандидата для разработки на его основе новых противоопухолевых соединений.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, микроРНК, протеинкиназа Akt, тамоксифен, рапамицин, резистентность

**Для цитирования:** Андреева О.Е., Сорокин Д.В., Щербаков А.М. и др. Сигнальный путь микроРНК-484/Akt в регуляции чувствительности клеток рака молочной железы к противоопухолевым препаратам. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(4):112–6. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-112-116

## MicroRNA-484/Akt axis in the regulation of breast cancer cells sensitivity to antitumor drugs

O.E. Andreeva, D.V. Sorokin, A.M. Scherbakov, Y.Y. Shchegolev, M.V. Gudkova, M.A. Krasil'nikov

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115522, Russia

**Contacts:** Mikhail Aleksandrovich Krasil'nikov [krasilnikovm1@yandex.ru](mailto:krasilnikovm1@yandex.ru)

The development of acquired resistance of malignant tumors to specific drugs, such as target and hormonal drugs, is usually associated with a rearrangement of the intracellular signaling network and activation of unblocked growth pathways. Epigenetic regulators, in particular, non-coding miRNAs that control the level of expression of specific signaling proteins, are directly involved in the development and maintenance of such changes. We have previously shown that the development of resistance of breast cancer cells to mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibitors and hormonal drugs is accompanied by constitutive activation of protein kinase Akt, the key anti-apoptotic protein.

**Aim.** To study the role of microRNAs in the regulation of Akt expression and the formation of a resistant phenotype of breast cancer cells.

We have shown that Akt activation in the tamoxifen- or rapamycin-resistant MCF-7 sublines is associated with a decrease in the level of miRNA-484, one of the Akt suppressors. Transfection of microRNA-484 into MCF-7 cells does not affect the activity of estrogen signaling, but leads to a marked decrease in Akt expression and is accompanied by an increase in cell sensitivity to tamoxifen and rapamycin. The obtained data demonstrate the involvement of the miRNA-484/Akt axis

in the breast cancer cells' sensitization to target and hormonal drugs, which allows us to consider miRNA-484 as a potential candidate for drug development to cure resistant cancers.

**Keywords:** breast cancer, microRNA, protein kinase Akt, tamoxifen, rapamycin, resistance

**For citation:** Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2022;9(4):112–6. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-112-116

## ВВЕДЕНИЕ

Как известно, развитие резистентности опухолевых клеток к препаратам направленного действия, таким как таргетные соединения или гормональные препараты, сопряжено с перестройкой сигнальной сети и активацией параллельных, незаблокированных, сигнальных путей. Ранее в экспериментах на культивируемых *in vitro* клетках рака молочной железы (РМЖ) MCF-7 мы показали, что развитие резистентности к ингибиторам mTOR (mammalian target of rapamycin) (рапамицину, метформину) и блокаторам эстрогенового сигналинга (антиэстрогену тамоксифену) в обоих случаях сопровождается конститутивной активацией протеинкиназы Akt – основного антиапоптотического белка [1–3].

Одними из ключевых эпигенетических регуляторов в клетках являются некодирующие микроРНК, изменение содержания которых может во многом определять уровень экспрессии конкретных сигнальных белков. Идентифицированы микроРНК, ответственные за регуляцию экспрессии/активности протеинкиназы Akt, среди которых центральное место занимает микроРНК-484, активно экспрессируемая в клетках РМЖ [4–7]. МикроРНК-484 длиной 22 нуклеотида локализована в промоторной области гена MARF1 (meiosis regulator and mRNA stability factor 1) на хромосоме 16p13.11 в человеческом геноме. Физиологические функции miR-484 у млекопитающих многогранны и включают влияние на стресс эндоплазматического ретикулума, окислительный стресс, воспаление, пролиферацию клеток и апоптоз [8].

**Целью** настоящей работы явилось дальнейшее изучение роли протеинкиназы Akt в формировании и поддержании резистентного фенотипа клеток и исследование влияния микроРНК-484 на экспрессию протеинкиназы Akt и чувствительность клеток РМЖ к противоопухолевым препаратам.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились на культивируемых *in vitro* клетках РМЖ MCF-7 (АТСС НТВ-22™). В работе использовались методы, представленные ниже.

**Культивирование клеток.** Клетки РМЖ человека линии MCF-7 культивировали в стандартной среде DMEM (ООО «ПанЭко», Россия), содержащей 4,5 г/л глюкозы, 10 % эмбриональной сыворотки телят (FBS NuClone, США) и гентамицин (50 ед./мл) (ООО «ПанЭко», Россия) при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>. Культивирование клеток выполняли в инкубаторе NU-5840E (NuAir,

США). Тамоксифен-резистентная сублиния MCF-7 была получена при длительном культивировании родительских клеток с тамоксифеном, как описано ранее [9]. При анализе скорости роста количество клеток определяли с использованием МТТ-теста, основанного на восстановлении живыми клетками реагента МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2) – 2,5-дифенилтетразол бромида) в кристаллы формазана (нерастворимые в культуральных средах).

**Анализ микроРНК.** Подготовка библиотек и сиквенс проводились ЗАО «Геноаналитика» (Россия). Экстракция микроРНК выполнялась с помощью наборов PureLink RNA Micro Kit (#12183–016, Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Подготовка библиотек проводилась с помощью наборов NEBNext Small RNA Library Prep Set for Illumina (E7330S).

**Конструкции микроРНК.** В работе использовались следующие конструкции микроРНК (ООО «Синтол», Россия): 1) для проведения контрольной трансфекции – микроРНК scrambled (случайная последовательность): scr. miR forward 5'-P-UUCUCCGAACGUGU-CACGU-OH-3', scr. miR reverse 5'-P-ACGUGACACGU UCGGAGAA-OH-3'; 2) микроРНК-484: hsa-miR-484 forward 5'-P-UCAGGCUCAGUCCCCUCCCGAU-OH-3', hsa-miR-484 reverse 5'-P-CCCGGGGGUGACCCUG GCU-OH-3. РНК растворяли в буфере (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) в концентрации 100 мкМ и проводили отжиг по стандартной методике. Трансфекцию РНК в конечной концентрации 50 нМ выполняли с использованием реагента Lipofectamine 2000 PRO (Thermo Fisher Scientific) по методике производителя.

**Репортерный анализ.** Для определения транскрипционной активности рецептора эстрогенов проводили трансфекцию клеток плазмидой, содержащей ген репортер люциферазы под контролем промотора с эстроген-респонсивным элементом, любезно предоставленной Dr. George Reid [10]. Для контроля за эффективностью и потенциальной токсичностью процедуры трансфекции применяли котрансфекцию клеток плазмидой, содержащей ген β-галактозидазы. Активность люциферазы измерялась по стандартному протоколу (Promega, США) на люцинометре Tecan Infinite M200 Pro (США). Расчет активности люциферазы проводили в условных единицах (отношение общей активности люциферазы к активности галактозидазы в исследованных образцах).

**Иммуноблоттинг.** Клетки на стадии формирования 80 % монослоя дважды промывали на чашках (60 мм;

Corning, США) 2 мл фосфатного буфера. Для получения тотального клеточного экстракта к образцам добавляли по 130 мкл буфера следующего состава: 50 мМ Трис-НСl pH 7,4, 1 % Igepal CA-630, 150 мМ NaCl, 1 мМ тетраацетата этилендиамина, 1 мМ дитиотреитола, 1 мкг/мл аprotинина, лейпептина и пепстатина, 1 мМ фторида натрия и ортованадата натрия (Merck, США). Образцы клеточных экстрактов центрифугировали (10 000 g, 10 мин, 4 °С, центрифуга Eppendorf 5417R) и проводили стандартный электрофорез и иммуноблоттинг, как описано ранее [1]. В цитозольных экстрактах исследовали содержание рецептора эстрогена  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), Akt, phospho-Akt (Cell Signaling Technology, США). Для контроля эффективности иммуноблоттинга использовали антитела к  $\alpha$ -тубулину (Cell Signaling Technology, США).

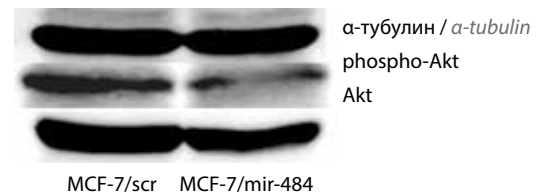
Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Microsoft Excel. Во всех случаях статистические критерии считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Анализ микроРНК в родительских и резистентных клетках MCF-7.** При изучении внутриклеточного пула микроРНК было выявлено более 600 вариантов микроРНК, активно экспрессируемых в клетках MCF-7. Сравнительный анализ профиля микроРНК в клетках MCF-7 и тамоксифен-резистентных клетках MCF-7/T позволил идентифицировать свыше 60 микроРНК, экспрессия которых не менее чем на 50 % снижена в резистентных клетках. Последующий анализ *in silico* биологической активности идентифицированных микроРНК показал присутствие среди микроРНК, экспрессия которых снижена в резистентных клетках MCF-7/T, микроРНК-484, являющейся супрессором Akt и активно синтезируемой клетками РМЖ. В дальнейших экспериментах по трансфекции в клетки MCF-7 микроРНК-484 мы продемонстрировали выраженное подавление экспрессии и активности Akt при накоплении в клетках микроРНК-484 (рис. 1).

**МикроРНК-484 и эстрогеновый сигналинг.** Для исследования возможного влияния микроРНК-484 на гормональный аппарат клеток был проведен анализ экспрессии и активности рецептора эстрогенов в клетках MCF-7 после трансфекции микроРНК. Как видно из представленных данных, ни экспрессия, ни транскрипционная активность эстрогенового рецептора не снижались в присутствии микроРНК-484, что позволяет исключить непосредственное влияние последней на эстрогеновый сигналинг (рис. 2).

**Влияние микроРНК-484 на чувствительность клеток к тамоксифену и рапамицину.** Представленные выше данные, а именно: 1) способность микроРНК-484 подавлять экспрессию и активность протеинкиназы Akt и 2) сниженное содержание микроРНК-484, наряду с высокой активностью Akt, в резистентных клетках позволили предположить, что направленное снижение



**Рис. 1.** Иммуноблоттинг образцов клеток MCF-7 после трансфекции микроРНК/scrambled и микроРНК-484. Гибридизация проводилась с антителами к phospho-Akt и Akt, нанесение белков контролировалось по гибридизации с антителами к  $\alpha$ -тубулину. Представлены результаты одного из 3 независимых экспериментов

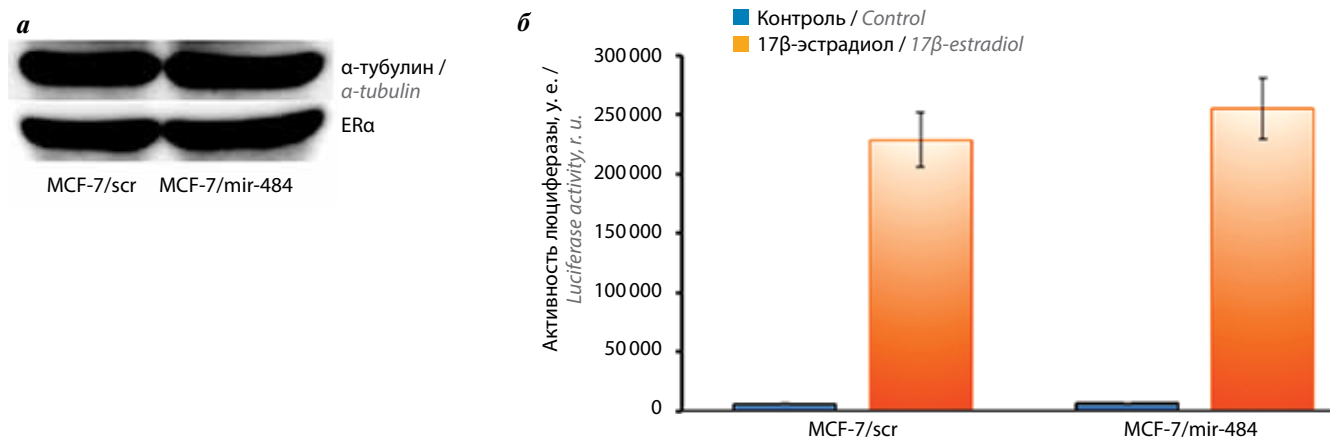
**Fig. 1.** Immunoblotting of the protein samples from MCF-7 cells transfected with mir/scrambled and mir-484. The hybridization was performed with the antibodies against phospho-Akt and Akt, protein loading was controlled by membrane hybridization with  $\alpha$ -tubulin antibodies. The blot represents the results of one of the three similar experiments

активности последней, в том числе через сигнальный путь микроРНК-484/Akt, может приводить к повышению чувствительности клеток РМЖ к противоопухолевым агентам. Для проверки этого предположения были проведены эксперименты по оценке чувствительности клеток MCF-7 к тамоксифену и рапамицину после трансфекции микроРНК-484. Мы обнаружили, что трансфекция последней в клетки приводит к заметному повышению чувствительности клеток к цитостатическому действию обоих препаратов (рис. 3). Это свидетельствует о непосредственном участии микроРНК-484 в регуляции ответа опухолевых клеток на цитостатические агенты.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

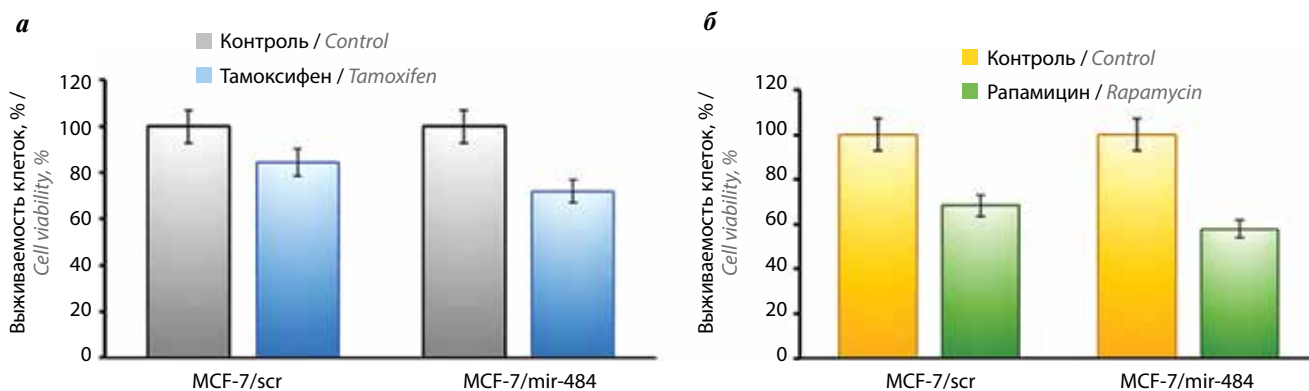
Развитие приобретенной лекарственной устойчивости опухолевых клеток является одним из основных факторов, ограничивающих эффективность применения химиотерапии для лечения злокачественных новообразований. В связи с этим особое внимание в современных онкологических исследованиях уделяется поискам экспериментальных подходов, направленных на повышение чувствительности и преодоление резистентности опухолей к химиопрепаратам [11–13]. В настоящей работе мы показали, что описанное нами ранее повышение активности протеинкиназы Akt в сублиниях MCF-7, резистентных к тамоксифену или рапамицину, ассоциировано со снижением уровня микроРНК-484 – одного из супрессоров Akt. Было продемонстрировано, что трансфекция в клетки MCF-7 микроРНК-484 не влияет на активность эстрогенового сигналинга, но приводит к выраженному снижению экспрессии Akt и сопровождается повышением чувствительности клеток к тамоксифену и рапамицину.

В целом полученные данные свидетельствуют об участии сигнального пути микроРНК-484/Akt в сенсбилизации клеток РМЖ к действию таргетных и гормональных препаратов, что позволяет рассматривать микроРНК-484 в качестве возможного перспективного кандидата для разработки на его основе новых противоопухолевых соединений.



**Рис. 2.** Экспрессия и транскрипционная активность рецептора эстрогенов  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) в клетках MCF-7 после трансфекции микроРНК/scrambled и микроРНК-484: а – иммуноблоттинг образцов клеток с антителами к  $ER\alpha$ , нанесение белков контролировалось по гибридизации с антителами к  $\alpha$ -тубулину. Представлены результаты одного из 3 независимых экспериментов; б – репортерный анализ транскрипционной активности  $ER\alpha$ . Клетки MCF-7 после трансфекции микроРНК трансфицировали плазмидой, содержащей ген-репортер люциферазы под контролем промотора с эстроген-респонсивным элементом, и плазмидой, содержащей ген  $\beta$ -галактозидазы. Расчет активности люциферазы проводили в условных единицах (отношение общей активности люциферазы к активности  $\beta$ -галактозидазы в исследованных образцах). Представлены средние значения  $\pm$  SD 3 независимых экспериментов

**Fig. 2.** Expression level and transcriptional activity of estrogen receptor ( $ER\alpha$ ) in the MCF-7 cells transfected with mir/scrambled and mir-484: a – immunoblotting of the protein samples with antibodies to  $ER\alpha$ , protein loading was controlled by membrane hybridization with  $\alpha$ -tubulin antibodies. The blot represents the results of one of the three similar experiments; б – reporter analysis of the transcriptional activity of  $ER\alpha$ . Mir/scrambled and mir-484-transfected MCF-7 cells were transfected with the plasmid containing the luciferase reporter gene under the estrogen-responsive elements, and  $\beta$ -galactosidase plasmid. The relative luciferase activity was calculated in arbitrary units as the ratio of the luciferase to the galactosidase activity. Data represent mean value  $\pm$  SD of three independent experiments



**Рис. 3.** Чувствительность клеток MCF-7 после трансфекции микроРНК/scrambled и микроРНК-484 к тамоксифену (а) и рапамацину (б). Клетки культивировали в течение 3 сут в присутствии 5  $\mu$ M тамоксифена или 1  $\mu$ M рапамацина, количество выживших клеток определяли с помощью МТТ-теста. Представлены средние значения  $\pm$  SD 3 независимых экспериментов

**Fig. 3.** The sensitivity of the mir/scrambled and mir-484-transfected MCF-7 cells to tamoxifen (a) and rapamycin (б). The cells were treated with 5  $\mu$ M tamoxifen or 1  $\mu$ M rapamycin for three days and the cell viability was assessed by the MTT-test. Data represent mean value  $\pm$  SD of three independent experiments

## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Shchegolev Y., Sorokin D., Scherbakov A. et al. Upregulation of Akt/Raptor signaling is associated with rapamycin resistance of breast cancer cells. *Chem Biol Interact* 2020;330:109243. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109243
- Semina S.E., Scherbakov A.M., Vnukova A.A. et al. Exosome-mediated transfer of cancer cell resistance to antiestrogen drugs. *Molecules* 2018;23(4):829. DOI: 10.3390/molecules23040829
- Scherbakov A.M., Sorokin D.V., Tatarskiy V.V. Jr. et al. The phenomenon of acquired resistance to metformin in breast cancer cells: the interaction of growth pathways and estrogen receptor signaling. *IUBMB Life* 2016;68(4):281–92. DOI: 10.1002/iub.1481
- Liu J., Li S.M. MiR-484 suppressed proliferation, migration, invasion and induced apoptosis of gastric cancer via targeting CCL-18. *Int J Exp Pathol* 2020;101(6):203–14. DOI: 10.1111/iep.12366
- Holubekova V., Kolkova Z., Grendar M. et al. Pathway analysis of selected circulating miRNAs in plasma of breast cancer patients: a preliminary study. *Int J Mol Sci* 2020;21(19):7288. DOI: 10.3390/ijms21197288
- Wie Y., Li H., Qu Q. MiR-484 suppresses endocrine therapy-resistant cells by inhibiting KLF4-induced cancer stem cells in estrogen receptor-positive cancers. *Breast Cancer* 2021;28(1):175–86. DOI: 10.1007/s12282-020-01152-6
- Shi W., Dong F., Jiang Y. et al. Construction of prognostic microRNA signature for human invasive breast cancer by integrated analysis. *Onco Targets Ther* 2019;12:1979–2010. DOI: 10.2147/OTT.S189265
- Jia Y.Z., Liu J., Wang G.Q., Song Z.F. MiR-484: a potential biomarker in health and disease. *Front Oncol* 2022;12:830420. DOI: 10.3389/fonc.2022.830420
- Semina S.E., Scherbakov A.M., Kovalev S.V. et al. Horizontal transfer of tamoxifen resistance in MCF-7 cell derivatives: proteome study. *Cancer Invest* 2017;35(8):506–18. DOI: 10.1080/07357907.2017.1368081
- Reid G., Hubner M.R., Metivier R. et al. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 2003;11:695–707. DOI: 10.1016/S1097-2765(03)00090-X
- Xu W., Ye C., Qing X. et al. Multi-target tyrosine kinase inhibitor nanoparticle delivery systems for cancer therapy. *Mater Today Bio* 2022;16:100358. DOI: 10.1016/j.mtbio.2022.100358
- El Sayed R., El Jamal L., El Iskandarani S. et al. Endocrine and targeted therapy for hormone-receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer: insights to sequencing treatment and overcoming resistance based on clinical trials. *Front Oncol* 2019;9:510. DOI: 10.3389/fonc.2019.00510
- Gámez-Chiachio M., Sarrió D., Moreno-Bueno G. Novel therapies and strategies to overcome resistance to anti-HER2-targeted drugs. *Cancers (Basel)* 2022;14(18):4543. DOI: 10.3390/cancers14184543

**Вклад авторов**

О.Е. Андреева: дизайн исследования, репортерный и МТТ-анализ;  
 Д.В. Сорокин: электрофорез и Вестерн-блоттинг образцов;  
 А.М. Щербаков: статистическая обработка данных, анализ полученных данных;  
 Ю.Ю. Щеголев: культуральная работа, МТТ-анализ;  
 М.В. Гудкова: культуральная работа, обзор публикаций;  
 М.А. Красильников: идея и организация исследования, написание текста статьи.

**Authors' contributions**

O.E. Andreeva: research design, reporter and MTT analysis;  
 D.V. Sorokin: electrophoresis and Western blotting of the samples;  
 A.M. Scherbakov: statistical data analysis; analysis of the experimental data;  
 Y.Y. Shchegolev: culture work; MTT analysis;  
 M.V. Gudkova: culture work, review of the publications;  
 M.A. Krasil'nikov: idea and organization of the study, article writing.

**ORCID авторов/ ORCID of authors**

О.Е. Андреева / O.E. Andreeva: <https://orcid.org/0000-0002-6015-6619>  
 Д.В. Сорокин / D.V. Sorokin: <https://orcid.org/0000-0002-1264-7405>  
 А.М. Щербаков / A.M. Scherbakov: <https://orcid.org/0000-0002-2974-9555>  
 Ю.Ю. Щеголев / Y.Y. Shchegolev: <https://orcid.org/0000-0002-1490-6781>  
 М.В. Гудкова / M.V. Gudkova: <https://orcid.org/0000-0003-2694-5232>  
 М.А. Красильников / M.A. Krasil'nikov: <https://orcid.org/0000-0002-5902-7633>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-15-00245) (<https://rscf.ru/project/22-15-35008/>).

**Funding.** The work was carried out with the financial support of the Russian Scientific Foundation (grant No. 19-15-00245) (<https://rscf.ru/project/22-15-35008/>).

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики.** Работа не содержит описания исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

**Compliance with patients rights and principles of bioethics.** This article does not describe any research involving humans or animals as subjects.

**Статья поступила:** 23.10.2022. **Принята к публикации:** 22.11.2022.

**Article submitted:** 23.10.2022. **Accepted for publication:** 22.11.2022.