

Эффект негативной регуляции эстрогенового сигналинга под действием экзосом: роль в развитии резистентности клеток рака молочной железы

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

НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24, стр. 15

Контакты: Михаил Александрович Красильников krasilnikovm1@yandex.ru

Наиболее эффективным методом лечения гормонозависимых опухолей молочной железы является использование антиэстрогенов группы SERM и ингибиторов ароматазы, однако их применение ограничивается постепенным развитием резистентности опухолей к препаратам.

Ранее мы продемонстрировали распространение гормональной резистентности от резистентных к чувствительным клеткам рака молочной железы в условиях совместного культивирования *in vitro* и установили непосредственное участие экзосом в этом процессе.

В настоящей работе мы показали, что экзосомы резистентных клеток вызывают существенное подавление эстрогенового сигналинга в клетках-реципиентах, и идентифицировали микроРНК, гиперэкспрессированные в экзосомах резистентных клеток и являющиеся ингибиторами рецептора эстрогенов ERα. Полученные результаты свидетельствуют о ключевой роли подавления эстрогенового сигналинга в распространении экзосоминдуцированной резистентности и об участии экзосомальных микроРНК в негативной регуляции ERα.

Ключевые слова: экзосомы, гормональная резистентность, микроРНК, рецептор эстрогенов ERα

Для цитирования: Сорокин Д.В., Андреева О.Е., Михеевич Е.И. и др. Эффект негативной регуляции эстрогенового сигналинга под действием экзосом: роль в развитии резистентности клеток рака молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2020;7(3):58–62.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-3-58-62



Effect of the exosome-mediated suppression of the estrogen signaling: the role in the progression of the hormonal resistance of breast cancer cells

D. V. Sorokin, O. E. Andreeva, E. I. Mikhaevich, Yu. Yu. Shchegolev, A. M. Scherbakov, 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;
Build. 15, 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

The most effective treatment of the hormone-dependent breast cancer is based on the antiestrogens SERM and aromatase inhibitor treatment, however its efficiency is limited by the acquired resistance to the drugs.

Previously we have revealed the effect of the transferring of the hormonal resistance from the resistant to the sensitive cells under *in vitro* cell co-cultivation, and demonstrated exosomes involvement in this process. Here we have shown that the exosomes of the resistant cells caused the marked inhibition of the estrogen signaling in the recipient cells, and identified microRNAs — ERα suppressors that overexpressed in the resistant exosomes.

Taken together, the results obtained demonstrate the important role of the estrogen signaling suppression in the exosome-induced transferring of the hormonal resistance, and revealed the involvement of the exosomal microRNA in the ERα down-regulation

Key words: exosomes, hormonal resistance, microRNAs, estrogen receptor ERα

For citation: Sorokin D.V., Andreeva O.E., Mikhaevich E.I. et al. Effect of the exosome-mediated suppression of the estrogen signaling: the role in the progression of the hormonal resistance of breast cancer cells. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2020;7(3):58–62. (In Russ.).

Экзосомы представляют собой микровезикулы размером 30–100 нм, продуцируемые клетками в окружающую среду и содержащие целый спектр биологически активных молекул, включая различные типы

РНК, ДНК, белков и липидов. Ключевая особенность экзосом — их способность проникать внутрь клеток-реципиентов, вызывая каскад изменений на геномном (за счет интеграции ДНК) и эпигеномном (за счет

изменения экспрессии/содержания белков, микроРНК и др.) уровнях.

Как известно, устойчивость к различного рода повреждающим и цитостатическим агентам является одной из универсальных характеристик злокачественных новообразований. Результаты последних исследований экзосом показали, что формирование резистентного фенотипа опухолевых клеток происходит в том числе с участием экзосом, которые могут обеспечивать распространение резистентности по всему пулу опухолевых клеток [1]. Развитие подобной индуцированной *de novo* резистентности напрямую связано с уникальным составом «резистентных» донорских экзосом. В разных случаях решающим фактором может служить накопление в экзосомах либо АВС-транспортеров, либо соответствующих микроРНК и матричных РНК, а скорее всего — комплекс этих факторов, что в итоге приводит к формированию и поддержанию резистентного фенотипа в клетках-реципиентах. Как показано в работах последних лет, экзосомы участвуют в распространении не только множественной лекарственной устойчивости, но и в развитии резистентности к препаратам направленного действия, в том числе к таргетным препаратам, гормональным соединениям.

Ранее мы показали возможность распространения резистентности на чувствительные клетки рака молочной железы в условиях совместного культивирования с резистентными клетками и продемонстрировали непосредственное участие экзосом в развитии приобретенной гормональной резистентности. Мы показали, что регулярное добавление к клеткам эстрогензависимого рака молочной железы MCF-7 экзосом, полученных от тамоксифенрезистентных клеток MCF-7/T, приводит к развитию частичной резистентности клеток MCF-7 к антиэстрогену тамоксифену. В то же время экзосомы, полученные от родительских клеток MCF-7, не обладают такой активностью, и их добавление не приводит к изменению гормональной чувствительности клеток [2]. Сравнительный анализ карго экзосом родительских и резистентных клеток выявил значительные изменения в составе протеома и профиля микроРНК экзосом резистентных клеток [3], однако вопрос о молекулярном механизме экзосом-индуцированной резистентности остается открытым.

Настоящие эксперименты были выполнены на культивируемых *in vitro* клетках рака молочной железы MCF-7 и резистентной сублинии MCF-7/T, полученной в результате длительного культивирования клеток родительской линии с антиэстрогеном тамоксифеном. Экзосомы выделяли из кондиционированной среды стандартным методом ультрацентрифугирования, для характеристики полученных препаратов применяли методы электронной микроскопии, анализ наночастиц (nanoparticle tracking analysis, NTA) и иммуноблоттинг, как было описано [2]. Транскрипционную активность рецептора эстрогенов ER α определяли

методом репортерного анализа с использованием плазмиды, содержащей ген люциферазы под контролем эстроген-респонсивного элемента (ERE) [4]. Анализ экзосомальной микроРНК был проведен ЗАО «Геноаналитика» (Москва, Россия) на секвенаторе HiSeq2500, минимальное число прочтений составило 5 млн на образец. Для экстракции микроРНК применяли набор реактивов PureLink RNA Micro Kit (#12183-016), подготовку библиотеки проводили с использованием NEBNext Small RNA Library Prep Set for Illumina (E7330S). Синтез микроРНК-миметиков был выполнен ЗАО «Синтол», трансфекцию осуществляли стандартным методом в присутствии метафактена.

Мы показали, что культивирование клеток MCF-7 с экзосомами, полученными от резистентных клеток MCF-7/T, вызывает заметное подавление транскрипционной активности ER α , определяемого методом репортерного анализа, при этом экзосомы родительских клеток не приводят к подобным изменениям (рис. 1а). Эффект экзосомзависимого подавления ER был подтвержден независимым методом, по анализу экспрессии рецептора прогестерона — одного из ключевых эстрогензависимых белков: экзосомы резистентных, но не родительских клеток вызывали существенное снижение уровня прогестеронового рецептора в клетках (рис. 1б).

Для исследования возможного механизма экзосом-индуцированного подавления ER α был проведен сравнительный анализ профиля микроРНК экзосом родительских и резистентных клеток. В результате анализа идентифицировано более 400 микроРНК, гиперэкспрессированных в экзосомах резистентных клеток (табл. 1). Мы предположили, что одними из факторов, определяющих подавление эстрогенового сигналинга под действием «резистентных» экзосом, могут являться микроРНК, гиперэкспрессированные в экзосомах резистентных клеток и относящиеся к группе негативных регуляторов ER α . Действительно, биоинформатический анализ 471 микроРНК, гиперэкспрессированных в экзосомах резистентных клеток, выявил 6 микроРНК — супрессоров ER α (табл. 2). Методом репортерного анализа идентифицированные микроРНК были исследованы на предмет способности подавлять активность ER α . Полученные данные (рис. 2) продемонстрировали высокую ингибирующую активность как минимум 5 из 6 исследованных микроРНК.

Можно предположить, что экзосомы резистентных клеток, обогащенные микроРНК — супрессорами ER, вызывают развитие резистентности в клетках-реципиентах по такому же принципу, что и известные антигормональные препараты (антиэстрогены, ингибиторы ароматазы [5–7]). Действительно, хорошо известно, что длительное воздействие на опухоль таких препаратов приводит к развитию приобретенной резистентности, во многом как результат компенсаторной активации эстрогеннезависимых путей в условиях длительного блока эстрогенового сигналинга [8–10].

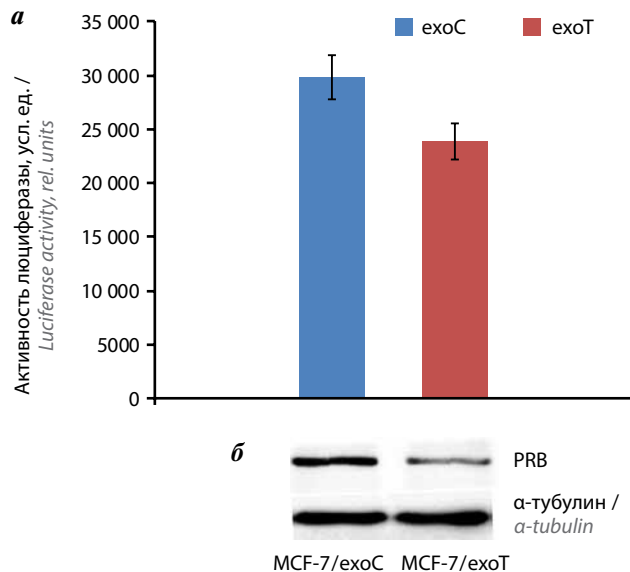


Рис. 1. Влияние экзосом клеток MCF-7 (exoC) и MCF-7/T (exoT) на транскрипционную активность ERα (а) и экспрессию рецептора прогестерона PRB (б). Активность ERα определяли методом репортерного анализа. Клетки трансфецировали ERE-плазмидой, содержащей ген люциферазы под контролем эстроген-респонсивного элемента [4], для контроля эффективности трансфекции использовали плазмиду, содержащую ген β-галактозидазы. Через 3 ч после трансфекции к клеткам добавляли препарат экзосом до концентрации 2 мкг/мл в присутствии 10 наноМ 17β-эстрадиола и через 24 ч определяли относительную активность люциферазы. Содержание рецептора прогестерона определяли методом иммуноблоттинга с антителами к рецептору прогестерона, для контроля содержания белка использовали гибридизацию с антителами к α-тубулину

Fig. 1. Influence of the exosomes of MCF-7 cells (exoC) and MCF-7/T cells (exoT) on the ERα transcriptional activity (a) and progesterone receptor PRB expression (b). ERα activity was determined by reporter analysis. Briefly, the cells were transfected with the ERE-plasmid encoding the luciferase gene under estrogen-responsive element [4], the efficiency of the transfection was controlled by the β-galactosidase plasmid transfection. After 3 hours the cells were treated with exosome preparations in the final concentration 2 μg/ml in the presence of 10 nM 17β-estradiol within 24 hours, and relative luciferase activity was measured according to manual. Progesterone receptor expression was determined by immunoblotting with antibody against progesterone receptor, the protein loading was controlled by the hybridization with tubulin antibody

Таблица 1. Сравнительный анализ микроРНК в клетках MCF-7/T и MCF-7

Table 1. Comparative analysis of the microRNA in the MCF-7/T and MCF-7 cells

Характеристика Characteristic	MCF-7/T vs MCF-7	
	Экзосомы Exosomes	Клетки Cells
Суммарный пул микроРНК Total microRNA	2589	2653
МикроРНК, гиперэкспрессированные в MCF-7/T vs MCF-7 MicroRNA overexpressed in MCF-7/T vs MCF-7	471	146
Гиперэкспрессированные микроРНК, общие для экзосом и клеток MCF-7/T Common microRNA overexpressed in the MCF-7/T exosomes and cells	21	

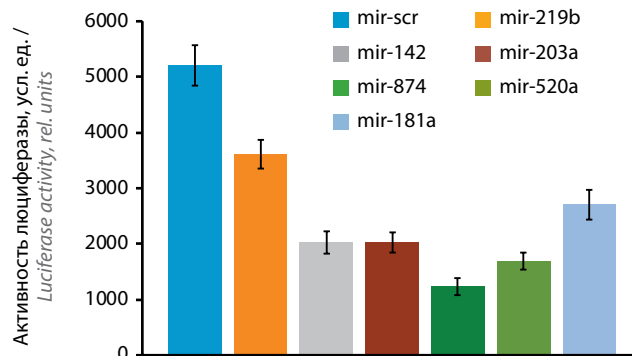


Рис. 2. Влияние микроРНК на транскрипционную активность ERα. Активность ERα определяли методом репортерного анализа, как описано в подписи к рис. 1. Через 3 ч после трансфекции ERE-плазмидой клетки трансфецировали соответствующими микроРНК-миметиками, культивировали 24 ч в присутствии 10 наноМ 17β-эстрадиола и определяли относительную активность люциферазы в клетках

Fig. 2. MicroRNA influence on the ERα transcriptional activity. ERα activity was determined by the reporter analysis as described in Fig. 1. 3 hours after ERE plasmid transfection the cells were transfected with the respective microRNA mimetics following with the cultivation within 24 hours in the presence of 10 nM 17β-estradiol, and relative luciferase activity in the cells was measured according to manual

Таблица 2. Экзосомальные микроРНК — супрессоры ERα

Table 2. Exosomal microRNA — ERα suppressors

МикроРНК — супрессоры ERα, гиперэкспрессированные в экзосомах MCF-7/T MicroRNA — ERα suppressors overexpressed in the MCF-7/T exosomes	Уровень активации микроРНК MicroRNA fold activation
142-3p	2
203a-3p	2
219b-5p	3
520a-3p	5
874-3p	4
181a	2

Собственно, именно так и была получена тамоксифенрезистентная сублиния MCF-7/T, на которой проводились настоящие эксперименты [11]. В данной работе мы показали, что экзосомы резистентных клеток вызывают существенное подавление эстрогенового сигналинга, и выявили микроРНК, гиперэкспрессированные в резистентных экзосомах и являющиеся ингибиторами ERα. Полученные результаты свидетельствуют в пользу предположения об универсальном механизме развития приобретенной резистентности, в основе которого как в случаях с резистентностью к антигормональным препаратам, так и в случаях с экзосоминдуцированной резистентностью лежит подавление эстрогенового сигналинга. С учетом известной плейотропности, многообразия мишеней микроРНК можно предположить, что микроРНК экзосом резистентных клеток не только подавляют эстрогеновый

сигналинг, но и участвуют в активации эстрогеннезависимого ростового сигналинга. В пользу такого предположения свидетельствует ранее продемонстрированная нами и другими авторами способность микроРНК-181, одного из супрессоров ER, одновременно активировать PI3K/Akt-сигнальный путь [12–14].

Вопрос о том, каким образом формируется столь специфический состав экзосом резистентных клеток, во многом остается открытым. При сравнении профиля микроРНК экзосом и самих клеток-продуцентов

оказалось, что из 471 микроРНК, гиперэкспрессированной в экзосомах резистентных клеток, только 21 микроРНК отличается повышенным содержанием в резистентных клетках, что свидетельствует о специфическом сортинге микроРНК в экзосомы (см. табл. 1). Мы рассчитываем, что последующие исследования позволят установить механизм специфического отбора микроРНК в экзосомы и оценить роль каждой из микроРНК – супрессоров ER в развитии экзосоминдуцированной резистентности.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Семина С.Е., Руденская Е.А., Миттенберг А.Г. и др. Экзосомы и развитие резистентности опухолевых клеток к метформину: пилотное исследование. Успехи молекулярной онкологии 2017;4(3):92–8. [Semina S.E., Rudenskaya E.A., Mittenberg A.G. et al. Exosomes and development of cancer cell resistance to metformin: pilot study. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2017;4(3):92–8. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-92-98.
2. Semina S.E., Scherbakov A.M., Vnukova A.A. et al. Exosome-mediated transfer of cancer cell resistance to anti-estrogen drugs. *Molecules* 2018;23(4):829. DOI: 10.3390/molecules23040829.
3. Семина С.Е., Барлев Н.А., Миттенберг А.Г., Красильников М.А. Сравнительный анализ экзосом клеток эстроген-резистентного рака молочной железы. Сибирский онкологический журнал 2018;17(4):36–40. [Semina S.E., Barlev N.A., Mittenberg A.G., Krasil'nikov M.A. Comparative analysis of the exosomal cargo of the estrogen-resistant breast cancer cells. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2018;17(4):36–40. (In Russ.)]. DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-4-36-40.
4. 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(3):695–707. DOI: 10.1016/s1097-2765(03)00090-x.
5. McAndrew N.P., Finn R.S. Management of ER positive metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 2020. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2020.07.005.
6. Spinello A., Ritacco I., Magistrato A. Recent advances in computational design of potent aromatase inhibitors: open-eye on endocrine-resistant breast cancers. *Expert Opin Drug Discov* 2019;14(10):1065–76. DOI: 10.1080/17460441.2019.1646245.
7. 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.
8. Clarke R., Tyson J.J., Dixon J.M. Endocrine resistance in breast cancer – an overview and update. *Mol Cell Endocrinol* 2015;418(Pt 3(0–3)):220–34. DOI: 10.1016/j.mce.2015.09.035.
9. Suba Z. The pitfall of the transient, inconsistent anticancer capacity of antiestrogens and the mechanism of apparent antiestrogen resistance. *Drug Design, Develop Ther* 2015;9:4341–53. DOI: 10.2147/dddt.s89536.
10. Viedma-Rodríguez R., Baiza-Gutman L., Salamanca-Gómez F. et al. Mechanisms associated with resistance to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer (review). *Oncol Rep* 2014;32(1):3–15. DOI: 10.3892/or.2014.3190.
11. 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.
12. 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.
13. Zhang W.L., Zhang J.H. miR-181c promotes proliferation via suppressing PTEN expression in inflammatory breast cancer. *Int J Oncol* 2015;46(5):2011–20. DOI: 10.3892/ijo.2015.2896.
14. Zhuang L., Qu H., Cong J. et al. MiR-181c affects estrogen-dependent endometrial carcinoma cell growth by targeting PTEN. *Endocr J* 2019;66(6):523–33. DOI: 10.1507/endocrj.EJ18-0538.

Благодарность. Авторы выражают благодарность G. Reid и F. Gannon за предоставление репортерной плазмиды ERE-TK-LUC [4].

Acknowledgment. Authors express thanks to G. Reid и F. Gannon for the providing the reporter plasmid ERE-TK-LUC [4].

Вклад авторов

Д.В. Сорокин: работа с клетками, иммуноблоттинг;

О.Е. Андреева: работа с плазмидами и микроРНК;

Е.И. Михеевич: выделение экзосом;

Ю.Ю. Щеголев: характеристика препаратов экзосом;

А.М. Щербakov: работа с литературой, подготовка рукописи к печати;

М.В. Гудкова: подготовка рукописи к печати;

М.А. Красильников: общее руководство экспериментальной работой, написание текста статьи, анализ данных.

Authors' contributions

D.V. Sorokin: work with cells, immunoblotting;

O.E. Andreeva: work with plasmids and microRNA;

E.I. Mikhaevich: exosome isolation;
Yu.Yu. Shchegolev: characterization of exosome preparations;
A.M. Scherbakov: working with literature, preparing a manuscript for printing;
M.V. Gudkova: preparing a manuscript for printing;
M.A. Krasil'nikov: general guidance of experimental work, article writing, analysis of the data.

ORCID авторов / ORCID of authors

Д.В. Сорокин / D.V. Sorokin: <https://orcid.org/0000-0002-1264-7405>
О.Е. Андреева / O.E. Andreeva: <https://orcid.org/0000-0002-6015-6619>
Е.И. Михеевич / E.I. Mikhaevich: <https://orcid.org/0000-0002-1299-9080>
Ю.Ю. Щеголев / Yu.Yu. Shchegolev: <https://orcid.org/0000-0002-1490-6781>
А.М. Щербаков / A.M. Scherbakov: <https://orcid.org/0000-0002-2974-9555>
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. Исследование проведено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-09016).
Financing. The study was performed with the support of Russian Foundation for Basic Research (project No. 18-29-09016).