

УДК 577.385.5

©Коллектив авторов

УЧАСТИЕ ИНТЕГРИНА $\alpha 5\beta 1$ В МЕХАНИЗМАХ АПОПТОЗА И ЛЕКАРСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

*Г.Е. Морозевич, Н.И. Козлова, Н.А. Ушакова, М.Е. Преображенская, А.Е. Берман**

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва, Погодинская ул., 10; тел.: (499) 246-33-45; эл. почта: berman@ibmc.msk.ru

Клетки резистентной к доксорубину линии MCF-7Dox – производной от доксорубин-чувствительной линии MCF-7 карциномы молочной железы человека – отличаются от последней резким снижением экспрессии интегрин $\alpha 2\beta 1$ и увеличением экспрессии интегрин $\alpha 5\beta 1$. Подавление экспрессии этого рецептора в указанных клетках путём трансфекции $\alpha 5$ -специфической мРНК оказывало выраженный стимулирующий эффект на субстрат-зависимый апоптоз (аноиксис) и повышало чувствительность клеток к доксорубину. Торможение экспрессии $\alpha 5\beta 1$ в клетках MCF-7Dox сопровождается резким ингибированием активности сигнальных протеинкиназ Akt и Erk2. Полученные данные свидетельствуют об общности интегрин-опосредованных сигнальных механизмов, контролирующих апоптотическую гибель клеток при различных стрессовых воздействиях.

Ключевые слова: интегрины, аноиксис, опухолевый рост, лекарственная резистентность, сигнальные протеинкиназы.

ВВЕДЕНИЕ. Опухолевые клетки при злокачественной прогрессии приобретают свойства, в основе которых лежат модификации сигналов, индуцируемых внеклеточным матриксом. Эти изменения являются ключевыми в характерных для опухолевого роста нарушениях жизненно важных клеточных реакций - адгезии, пролиферации, апоптоза и др. [1, 2]. Одним из таких свойств является противодействие стрессу, вызванному разрывом связи клетки

* - адресат для переписки

ИНТЕГРИН $\alpha 5\beta 1$, АПОПТОЗ И ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ

с матриксом, т.е. приобретение способности к выживанию и росту в отсутствии этих связей. Или, другими словами, противодействие субстрат-зависимому апоптозу – аноикису. Другое свойство заключается в противостоянии стрессу, вызываемому лекарственными противоопухолевыми препаратами, т.е. приобретение лекарственной резистентности к одному или (чаще) нескольким препаратам – множественной лекарственной резистентности (МЛУ) [3, 4].

Основными посредниками в проведении сигналов от матрикса в клетку являются интегрины, и их роль в субстрат-зависимом апоптозе продемонстрирована многими исследователями [3, 5-7]. Механизм аноикиса в общих чертах состоит в том, что интегрины в комплексе с внеклеточным матриксом обеспечивают сигналы, препятствующие гибели клетки, а при нарушении матрикс-клеточных связей клетки подвергаются апоптозу. Этот же механизм, по-видимому, лежит в основе т.н. САМ (cell adhesion mediated) резистентности, заключающейся в том, что клетки, прикрепленные к матриксу, обладают более высокой лекарственной устойчивостью, по сравнению с клетками в суспензии [4, 8, 9].

Однако пути передачи интегрин-опосредуемых сигналов, контролирующих апоптоз, до конца не выявлены и требуют дальнейшего изучения. В частности, не ясно, способны ли интегрины передавать только защитный (антиапоптотический) сигнал, и гибель клеток при аноикисе обусловлена блокированием этого сигнала. Могут ли эти рецепторы при нарушении матрикс-клеточных контактов генерировать проапоптотический сигнал, ведущий к клеточной гибели? На модели растущих в культуре клеток карциномы кишечника нами было впервые установлено, что витронектин-специфический интегрин $\alpha v\beta 3$ генерирует сигнал, усиливающий апоптоз, который индуцируется нарушением контакта клеток с субстратом [10]. Способность стимулировать апоптотическую гибель клеток обнаружена у интегрин $\alpha 4\beta 1$ [11] и $\alpha 5\beta 1$ [12]. Следовательно, клетки, не экспрессирующие эти интегрины, обладают более высокой выживаемостью. Можно думать, что одним из механизмов формирования лекарственно-резистентной клеточной популяции является отбор клеток, не экспрессирующих один (или несколько) таких рецепторов. Однако неясно, обладают ли другие интегрины подобными свойствами.

Ранее нами было показано, что клетки аденокарциномы молочной железы человека, резистентные к нескольким цитостатикам, характеризуются резким снижением экспрессии интегринов $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha v\beta 5$ и существенным увеличением экспрессии рецептора $\alpha 5\beta 1$. Эти клетки проявляют значительно более высокую, по сравнению с родительскими клетками, резистентность к аноикису [13.] В настоящем исследовании установлено, что подавление экспрессии рецептора $\alpha 5\beta 1$ в клетках аденокарциномы с МЛУ резко усиливает аноикис этих клеток и снижает их резистентность к доксорубину.

МЕТОДИКА.

Клеточные линии и реагенты. Линия MCF-7Dox, любезно предоставленная д-ром А.А. Штилем (Российский онкологический центр, Москва), получена из линии MCF-7 карциномы молочной железы человека путём селекции клеток, выживающих в присутствии антибиотика доксорубина. Линия MCF-7Dox обладает высокой резистентностью (превышающей на 1-2 порядка таковую родительской линии) к противоопухолевым препаратам доксорубину, винкристину, таксолу и митоксантрон, т.е. характеризуется множественной лекарственной устойчивостью. Кроме того, линия MCF-7Dox экспрессирует высокоактивную форму белка Pgp170, ответственного за транспорт противоопухолевых препаратов из клетки [14, 15]. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% сыворотки эмбрионов коров, 2 mM L-глутамин, 100 ед/мл пенициллин и 100 мкг/мл стрептомицин, при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂ в присутствии 1,7 мкМ доксорубина. Во всех экспериментах использовали клетки в логарифмической фазе роста. В работе также использовали реагенты фирмы “Sigma” (США), за исключением специально оговоренных случаев; поликлональные антитела к $\alpha 5$ -интегриновой

субъединице ("Chemicon", США). Малые интерферирующие РНК (миРНК) к интегринам $\alpha 5$ -субъединице и β -актину и контрольная миРНК предоставлены фирмой "Santa Cruz Biotech" (США), антитела к киназам Akt и Erk фирмой "Cell Signaling Technology" (США), реагенты для реакции с обратной транскриптазой (ОТ) и ПЦР предоставлены фирмой "Invitrogen" (США).

Трансфекция миРНК. $(1-2) \times 10^5$ клеток в 1 мл среды DMEM без антибиотиков, содержащей 10% эмбриональной сыворотки, пассировали в 12-луночных планшетах до достижения 50% конфлюентности. Клетки трансфицировали 50 нМ (конечная концентрация) специфической миРНК или контрольной миРНК в течение 70 ч с использованием реагента для трансфекции ("Santa Cruz"), после чего клетки собирали обработкой трипсин/ЭДТА и использовали для дальнейших исследований. При исследовании влияния обработки клеток миРНК на аноиксис в клеточную культуру добавляли 1 мКи $[U-^{14}C]$ тимидина ("Amersham", Англия) за 18 часов до окончания трансфекции.

Индукцию и количественное определение аноиксиса осуществляли, как описано нами ранее [10, 13], путем инкубирования клеток, меченых ^{14}C -тимидином, на неадгезивном субстрате - полигидроксипропилметакрилате (поли-ГЭМ) и последующем измерении радиоактивности продуктов деградации ДНК во фракции, не осаждающейся ТХУ, и радиоактивности интактной ДНК, осаждающейся ТХУ. Аноиксис(%) = радиоактивность не осаждающейся ДНК / радиоактивность осаждающейся ДНК + радиоактивность не осаждающейся ДНК [16].

Выделение общей клеточной РНК, условия реакции с обратной транскриптазой, нуклеотидная последовательность праймеров и условия ПЦР описаны нами ранее [10, 13]. Иммуноблоттинг проводили, как описано нами ранее [17].

Лекарственная резистентность. $5 \cdot 10^3$ клеток в 190 мкл полной среды пассировали в 96-луночные планшеты в течение ночи, после чего добавляли 10 мкл раствора ADP до конечных концентраций 0–10 мкМ и инкубировали при 37°C в течение 72 ч. За 2 ч до окончания инкубации добавляли 20 мкл водного раствора МТТ (5 мг/мл). Формазан растворяли в ДМСО, определяли оптическую плотность (ОП) при 570 нм и рассчитывали количество жизнеспособных клеток в контрольных (инкубированных без цитостатика) и опытных пробах. Резистентность оценивали по индексу IC₅₀ (концентрация цитостатика, вызывающая гибель 50% клеток).

Статистический анализ. Различия между группами оценивали с помощью t-теста Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Блокирование экспрессии интегрин $\alpha 5 \beta 1$ стимулирует аноиксис клеток MCF-7Dox и снижает их лекарственную резистентность. Ранее нами было показано, что лекарственно-устойчивые клетки MCF-7Dox, по сравнению с родительской линией MCF-7, обладают в 4 раза более высокой резистентностью к субстрат-зависимому апоптозу [13]. Данные цитофлуориметрического анализа, проведенного нами ранее [17], показали, что клетки MCF-7Dox, в отличие от MCF-7, практически не экспрессируют интегрин $\alpha 2 \beta 1$ и интегрин семейства αv , но значительно превосходят их в экспрессии рецептора $\alpha 5 \beta 1$.

Обнаруженные различия в экспрессии интегринов можно рассматривать как случайный признак, не имеющий отношения к механизмам апоптоза. Однако, можно было предположить, что в клетках MCF-7Dox рецептор $\alpha 5 \beta 1$ выполняет функцию защиты в обоих типах стрессовых ситуаций – нарушение связи с матриксом и действие цитостатика.

Для проверки этого предположения исследовали влияние на аноиксис блокирования экспрессии $\alpha 5 \beta 1$ с помощью $\alpha 5$ -специфической миРНК. Из рисунка 1 видно, что в клетках MCF-7Dox, трансфицированных $\alpha 5$ -миРНК, экспрессия рецептора $\alpha 5 \beta 1$ существенно заблокирована как на стадии транскрипции гена так и синтеза белка.

Этот же рисунок свидетельствует, что блокирование экспрессии $\alpha 5 \beta 1$ увеличивает этот тип апоптоза примерно на 60%.

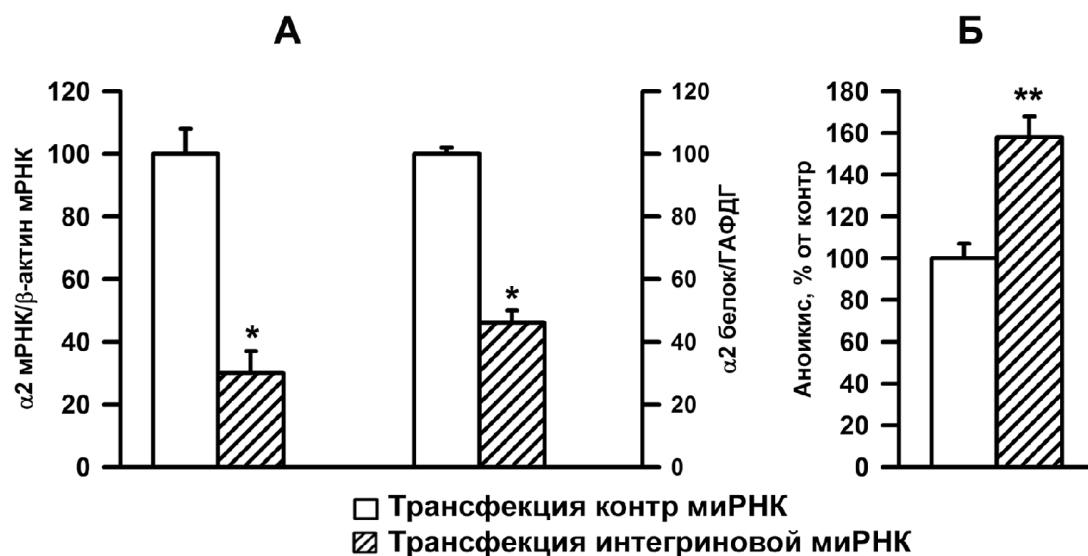


Рисунок 1.

Влияние трансфекции $\alpha 5$ миРНК на экспрессию интегриновых мРНК (левые столбики) и интегрин (правые столбики) в клетках MCF-7Dox (А) и на их аноикис (Б). Трансфекцию клеток миРНК и анализ экспрессии мРНК и белка проводили, как описано в "Методике". Отношение экспрессии интегриновой мРНК к экспрессии мРНК актина (ось ординат) или отношение экспрессии интегрин к экспрессии ГАФДГ (правая ось ординат) для клеток, трансфицированных контрольной миРНК, принимали за 100%. Представлены результаты (среднее \pm стандартная ошибка средней) трех экспериментов. Для определения аноикиса клетки трансфицировали соответствующими миРНК, промечивали ^{14}C -тимидином и определяли уровень аноикиса, как описано в "Методике". Аноикис клеток, трансфицированных контрольной миРНК, принимали за 100%. Представлены результаты (среднее \pm стандартная ошибка средней) трёх экспериментов.

* - $p < 0,01$ относительно контр миРНК; ** - $p < 0,05$ относительно контроля.

Для выяснения того, сопровождается ли изменение чувствительности клеток к аноикису (т.е. усиление их гибели при нарушении связи с субстратом) изменением также их лекарственной чувствительности, исследовали влияние ингибирования экспрессии $\alpha 5\beta 1$ на лекарственную резистентность клеток MCF-7Dox (рис. 2). Видно, что показатель IC_{50} (концентрация цитостатика, вызывающая гибель 50% клеток) снижается в 2 раза при трансфекции MCF-7Dox $\alpha 5$ -миРНК. Это свидетельствует о существенном снижении резистентности трансфицированных клеток к доксорубину.

Влияние блокирования экспрессии интегрин $\alpha 5\beta 1$ на активность сигнальных протеинкиназ. Участие интегринов в регулировании поведения клеток опосредуется в основном через два протеинкиназных сигнальных пути: PI-3K/Akt-зависимый и Erk-зависимый [3, 7]. Данные, представленные на рисунке 3, показывают, что в клетках MCF-7Dox торможение экспрессии интегрин $\alpha 5\beta 1$ приводит к снижению содержания активных форм двух киназ - Akt и Erk2. Ранее нами было показано, что блокирование экспрессии рецептора $\alpha 5\beta 1$ в линии MCF-7Dox индуцирует торможение активности указанных киназ, которое приводит к резкому уменьшению метастатического потенциала клеток этой линии [17]. Таким образом, $\alpha 5\beta 1$ -инициируемые сигналы, контролируемые различными поведенческими реакциями в исследуемых клетках, опосредуются через общие сигнальные пути.

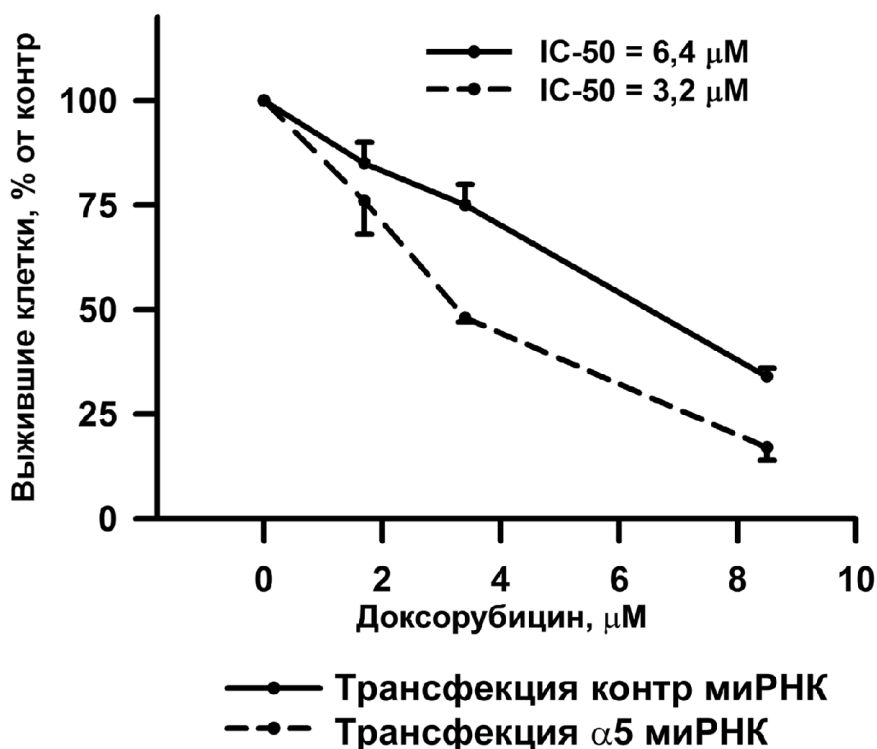


Рисунок 2.

Влияние трансфекции α5 миРНК на чувствительность клеток MCF-7 к доксорубину. Трансфекцию клеток миРНК и их обработку проводили, как описано в "Методике". Количество жизнеспособных клеток, обнаруженных после инкубации в отсутствие цитостатика, принимали за 100%. Приведены результаты двух независимых опытов (среднее ± стандартная ошибка средней).

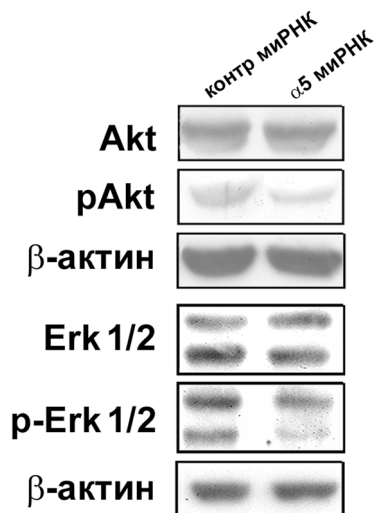


Рисунок 3.

Влияние трансфекции клеток MCF-7 α2 миРНК на экспрессию и активность протеинкиназ Akt и Erk1/2.

Клетки трансфицировали соответствующими миРНК, лизировали и 40 мкг белка клеточного лизата разделяли с помощью электрофореза в 7,5% DS-Na-ПААГ и подвергали электропереносу на нитроцеллюлозную мембрану. После инкубации с первичными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре мембрану инкубировали с HRP-конъюгированными вторичными антителами ("Amersham") в разведении 1 : 5000, проявляли в системе ECL (Enhanced Chemoluminescence, "Amersham") и сканировали. Представлен типичный иммуноблот.

ИНТЕГРИН $\alpha 5\beta 1$, АПОПТОЗ И ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ

Данные литературы относительно экспрессии и роли интегринов в апоптозе и лекарственной устойчивости противоречивы. Согласно общепринятой точке зрения, сигналы, генерируемые этими рецепторами, спасают клетки от апоптоза, вызванного различными факторами, в том числе, нарушением связи с субстратом. Так, было показано, что антагонисты $\alpha v\beta 3$, блокирующие его связь с матриксом и передачу сигналов, стимулируют апоптоз клеток эндотелия [18], некоторых линий клеток опухоли мозга [19] и меланомы [20].

Обнаруженная в настоящей работе антианоиксическая активность рецептора $\alpha 5\beta 1$ в лекарственно-устойчивых клетках карциномы молочной железы коррелирует с его ролью в клетках СНО [21]. Однако, по-видимому, функция этого рецептора в большой степени зависит от типа клеток. Так, в клетках карциномы поджелудочной железы сигналы, опосредуемые $\alpha 5\beta 1$, усиливают чувствительность к аноикису [22]. Стимулирование аноикиса наблюдали в клетках карциномы желудка как прямой результат повышения экспрессии $\alpha 5\beta 1$, обусловленного увеличением активных форм кислорода [23].

Сигнальные пути, по которым реализуется проапоптотическая активность интегринов, исследованы мало. Интегрин $\alpha 6\beta 4$ способствует выживанию клеток карциномы толстого кишечника с мутированным геном p53 и, напротив, стимулирует клеточную гибель после восстановления активности этого белка [24]. Оказалось, что в клетках, содержащих мутированный p53, $\alpha 6\beta 4$ активирует протеинкиназу Akt/PKB, которая участвует в защите клеток от апоптоза. Однако этот интегрин обладает также способностью стимулировать функции белка p53, который активирует систему каспаз, деградирующих Akt/PKB. Интересно, что сигнальные пути защиты от апоптоза и его стимуляции могут пересекаться. Например, протеинкиназа Erk не только участвует в защите от апоптоза, но в некоторых клетках фосфорилирует p53 и способствует его активации [25].

Другой аспект настоящей работы связан с ролью интегринов в лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Положительная корреляция между резистентностью опухолевых клеток к аноикису и их лекарственной резистентностью продемонстрирована в нескольких линиях эпителиальных клеток, экспрессирующих конститутивно активную форму киназы Akt. Оказалось, что эти линии наряду с резистентностью к субстрат-зависимому апоптозу приобретают устойчивость к митоксантрону и цисплатине [26]. Однако, в нетуморогенных клетках молочной железы активация Akt-зависимого и Erk-зависимого сигнальных путей увеличивает резистентность к аноикису, но не повышает, а снижает устойчивость к доксорубину [27].

Неоднозначность приведенных результатов можно объяснить тем, что многие интегрины обладают перекрывающимися лигандными функциями и, следовательно, разные рецепторы при взаимодействии с одним и тем же белком матрикса могут передавать физиологически равнозначные сигналы [6, 28]. Можно думать, что при эволюции конкретной клеточной популяции отбор осуществляется не по одному рецептору, а по спектру интегринов, который оказывается оптимальным для взаимодействия данной популяции с её микроокружением и развития определенного фенотипа – МЛУ, инвазивности, метастатической активности. Следовательно, каждый интегрин при определенном составе окружающего матрикса может быть вовлечен в механизмы злокачественной прогрессии опухолевых клеток, апоптоза, индуцируемого противоопухолевыми препаратами, и приобретения устойчивости к ним.

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (проекты 08-04-01102, 09-04-00421).

ЛИТЕРАТУРА

1. Marastoni S., Ligresti G., Lorenzon E., Colombatt A., Mongiat M. (2008) *Con. Tis. Res.*, **49**, 203-206.
2. Hynes R.O. (2009) *Science*, **326**, 1216-1219.
3. Chiarugi P., Giannoni E. (2008) *Biochem. Pharmac.*, **76**, 1352-1364.
4. Elliott T., Sethi T. (2002) *Expert. Rev. Anticancer Ther.*, **2**, 449-459.
5. Cheres D.A., Stupack D.G. (2002) *Nature Med.*, **8**, 193-194.
6. Берман А.Е., Козлова Н.И., Морозевич Г.Е. (2003) *Биохимия*, **68**, 1597-1615.
7. Desgrosellier J.S., Cheres D.A. (2010) *Nat. Rev. Cancer*, **10**, 9-22.
8. Chrenek M.A., Wong P., Weaver V.M. (2001) *Breast Cancer Res.*, **3**, 224-229.
9. Damiano J.S. (2002) *Curr. Cancer Drug Targets*, **2**, 37-43.
10. Kozlova N.I., Morozovich G.E., Chubukina A.N., Berman A.E. (2001) *Oncogene*, **20**, 4710-4717.
11. Fuente M.T., Casanova B., Cantero E., del Cerro M.H., Garcia-Marco J., Silva A., Garcia-Pardo A. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **311**, 708-712.
12. Rohwer N., Welzel M., Daskalow K., Pfander D., Wiedenmann B., Detjen K., Cramer T. (2008) *Cancer Res.*, **68**, 10113-10120.
13. Морозевич Г.Е., Козлова Н.И., Преображенская М.Е., Ушакова Н.А., Ельцов И.А., Штиль А.А., Берман А.Е. (2006) *Биохимия*, **71**, 607-614.
14. Tevyashova A.N., Shtil A.A., Olsufyeva E.N., Simonova V.S., Samusenko A.V., Preobrazhenskaya M.N. (2004) *J. Antibiot. (Tokyo)*, **57**, 143-150.
15. Kozlova N.I., Morozovich G.E., Chubukina A.N., Shtil A.A., Berman A.E. (2004) *EXCLI J.*, **3**, 68-81.
16. Rozzo C., Chiesa V., Caridi G., Pagnan G., Ponzoni M. (1997) *Int. J. Cancer*, **70**, 688-698.
17. Morozovich G., Kozlova N., Cheglakov I., Ushakova N., Berman A. (2009) *Cell Cycle*, **8**, 2219-2225.
18. Kuzuya M., Satake S., Ramos M.A., Kanda S., Koike T., Yoshino K., Ikeda S., Iguchi A. (1999) *Exp. Cell Res.*, **248**, 498-508.
19. Taga T., Suzuki A., Gonzalez-Gomez I., Gilles F.H., Stins M., Shimada H., Barsky L., Weinberg K.I., Laug W.E. (2002) *Int. J. Cancer*, **98**, 690-697.
20. Koistinen P., Ahonen M., Kahari V.M., Heino J. (2004) *Int. J. Cancer.*, **112**, 61-70.
21. Matter M.L., Ruoslahti E. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 27757-27763.
22. Plath T., Detjen K., Welzel M., von Marschall Z., Murphy D., Schirner M., Wiedenmann B., Rosewicz S. (2000) *J. Cell Biol.*, **150**, 1467-1477.
23. Rohwer N., Welzel M., Daskalow K., Pfander D., Wiedenmann B., Detjen K., Cramer T. (2008) *Cancer Res.*, **68**, 10113-10120.
24. Bachelder R.E., Marchetti A., Falcioni R., Soddu S., Mercurio A.M. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 20733-20737.
25. Persons D.L., Yazlovitskaya E.M., Pelling J.C. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 35778-35785.
26. Schmidt M., Hövelmann S., Beckers T.L. (2002) *Br. J. Cancer*, **87**, 924-932.
27. Vitolo M.I., Weiss M.B., Szmackinski M., Tahir K., Waldman T., Park B.H., Martin S.S., Weber D.J., Bachman K.E. (2009) *Cancer Res.*, **69**, 8275-8283.
28. Морозевич Г.Е., Козлова Н.И., Чубукина А.Н., Ельцов И.А., Берман А.Е. (2004) *Биохимия*, **69**, 817-827.

Поступила: 08. 02. 2010.

IMPLICATION OF INTEGRIN $\alpha 5\beta 1$ IN HUMAN BREAST CARCINOMA APOPTOSIS
AND DRUG RESISTANCE

G.E. Morozovich, N.I. Kozlova, N.A. Ushakova, M.E. Preobrazhenskaya, A.E. Berman

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Pogodinskaya 10,
Moscow, 119121 Russia; tel.: (495) 7083806; e-mail: berman@ibmc.msk.ru

Doxorubicin-resistant MCF-7Dox line, which is a derivative of the drug-sensitive MCF-7 human breast carcinoma line, differs from the latter by a strongly reduced expression of the $\alpha 2\beta 1$ integrin and a highly increased expression of the $\alpha 5\beta 1$ receptor. Silencing of this integrin in the MCF-7Dox cells by transfection with $\alpha 5$ -specific siRNA markedly stimulated anoikis and increased sensitivity of the cells to doxorubicin. $\alpha 5\beta 1$ silencing also leads to significant inhibition of the activity of kinases Akt and Erk2 in MCF-7Dox cells. Our results suggest that integrins $\alpha 5\beta 1$ -induced signals, controlling distinct aspects of cell behavior, are conducted through the common signal pathways.

Key words. integrins, anoikis, drug resistance, signal protein kinases.