

УДК 618.19-006.6;612.018;578.083

©Коллектив авторов

ЗНАЧЕНИЕ ПРОТЕИНКИНАЗЫ PAK1 В РЕГУЛЯЦИИ ЭСТРОГЕННЕЗАВИСИМОГО РОСТА КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.А. Авилова*, О.Е. Андреева, В.А. Шатская, М.А. Красильников

Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение “Российский
онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина” Российской академии
медицинских наук, 115478 Москва, Каширское ш.,24;
эл. почта: k_avilova@mail.ru

Основной задачей настоящей работы явилось исследование внутриклеточных сигнальных путей, ответственных за развитие гормональной резистентности и поддержание автономного роста клеток рака молочной железы, в частности – изучение роли PAK1 (p21-activated kinase 1), одного из ключевых митогенных сигнальных белков, в развитии резистентности клеток к эстрогенам. Исследования проведены на культивируемых *in vitro* клетках рака молочной железы: эстрогензависимой линии MCF-7 и резистентной рецептор-негативной линии HBL-100. Мы обнаружили, что клетки резистентной линии HBL-100 отличаются высоким содержанием PAK1 и продемонстрировали активное участие PAK1 в поддержании эстрогеннезависимого роста опухолевых клеток. При исследовании нижележащих сигнальных путей, активируемых PAK1, мы установили, что в число эффекторов PAK1 входит Snail1 – белок эпителиально-мезенхимального перехода, и показали его значение в регуляции пролиферации эстрогеннезависимых клеток.

В целом, полученные результаты демонстрируют участие PAK1 и Snail1 в формировании эстрогеннезависимого фенотипа клеток рака молочной железы и свидетельствуют о возможности использования этих белков в качестве маркеров развития гормональной резистентности опухолей молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы, рецепторы эстрогенов, PAK1, Snail1, резистентность.

* - адресат для переписки

ВВЕДЕНИЕ. Развитие гормональной резистентности злокачественных опухолей, или – в случае молочной железы – переход опухолевых клеток от эстрогензависимого к эстрогеннезависимому росту является одной из главных причин, ограничивающих эффективность гормональной терапии опухолей.

На сегодняшний день содержание рецепторов эстрогенов (ER) относится к основным критериям определения чувствительности больных раком молочной железы (РМЖ) к гормональным противоопухолевым препаратам [1-6]. Различают врожденную и приобретенную гормональную резистентность РМЖ (под последней подразумевают резистентность к гормональным препаратам, развившуюся в процессе терапии). В обоих случаях снижение гормональной зависимости может быть обусловлено как уменьшением содержания ER, так рядом других факторов, среди которых – нарушение баланса между белками-активаторами и супрессорами ER, лиганд-независимая активация ER; стимуляция сигнальных путей, независимых от ER (EGFR, PI3K, NF-kB) и поддерживающих тем самым рост РМЖ в отсутствие эстрогенов.

PAK1 (p21-activated kinase 1) – серин-треониновая протеинкиназа, которая активируется при образовании комплекса с малыми GTPазами Rho, Rac и Cdc42. Активированная PAK1 прямо или опосредованно контролирует широкий спектр сигнальных белков, ответственных за регуляцию ключевых функций клеток: роста, выживаемости, организацию цитоскелета. В основе такой регуляции лежит фосфорилирование с участием PAK1 соответствующих сигнальных белков, в том числе: BAD (антиапоптотический сигналинг), RAF-1 (клеточное деление), LIM kinase (цитоскелет) и др. [7, 8]. Примечательно, что в числе мишеней PAK оказался и рецептор эстрогенов: было установлено, что PAK-зависимое фосфорилирование ER приводит к эстрогеннезависимой активации последнего и способствует снижению гормональной зависимости ER-позитивных опухолей молочной железы [9-11]. Однако, столь широкий спектр активности PAK позволяет предположить, что и в ER-негативных опухолях активация этого сигнального пути может оказаться достаточной для стимуляции и поддержания уже эстрогеннезависимого роста клеток – косвенным свидетельством этому является описываемая в последних работах повышенная экспрессия PAK в ER-негативных клетках [12, 13].

Основной задачей работы является изучение роли PAK-сигнального пути в регуляции и поддержании гормоннезависимого роста опухолей молочной железы. В какой мере PAK1 необходим для активации эстрогеннезависимых митогенных путей в клетках РМЖ, действительно ли гиперэкспрессия PAK приводит к развитию гормональной резистентности, и каков в этом случае механизм действия PAK1 – вот главные вопросы настоящего исследования.

МЕТОДИКА. Клетки рака молочной железы человека линии MCF-7 и HBL-100 культивировали в стандартной среде DMEM, содержащей 5%-ную эмбриональную сыворотку телят (HyClone, США) и гентамицин (50 ед/мл) (“Paneco”, Россия) при 37°C и 5%-ном CO₂. При определении скорости роста клеток был использован МТТ-тест, основанный на утилизации живыми клетками МТТ-реакта (3-[4,5-диметилтиазол-2]-2,5-дифенилтетразол бромид) [14].

В трансфекционных экспериментах использовали плазмиду ERE/Luc, содержащую ген-репортер люциферазы под контролем эстроген-

чувствительного элемента (ERE) (любезно предоставлена Dr. G. Reid, European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, Heidelberg, D-69116, Germany) [15], плазмиду E-cad/Luc, содержащую ген-репортер люциферазы под контролем Snail1-чувствительного промотора (любезно предоставлена Dr. Antonio García de Herreros, Department of Experimental Sciences, Universitat Pompeu Fabra; Barcelona, Spain) [16], плазмиду, содержащую дикий вариант гена PAK1 (любезно предоставлена Jonathan Chernoff, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA) [21]). Репортерная конструкция, содержащая ген люциферазы под контролем бета-катенин-чувствительного промотора предоставлена В. Татарским (Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва, Россия). Плазмида AP1/Luc, содержащая ген люциферазы под контролем AP-1-чувствительного промотора, предоставлена V.V. Adler (Division of Hematology/Oncology, University of Alabama, Birmingham 35294).

Для контроля за эффективностью и потенциальной токсичностью процедуры трансфекции применяли котрансфекцию клеток плазмидой, содержащей ген β -галактозидазы. Расчет активности люциферазы проводили в условных единицах (отношение общей активности люциферазы к активности галактозидазы в исследованных образцах).

Для трансфекции коротких интерферирующих РНК использовали олигонуклеотиды следующих последовательностей: scrambled siRNA (sense 5'-CAGUCGCGUUUGCGACUGGdTdT-3'), Snail1 siRNA (sense 5'-aggccsucaacugcaauadttdt-3'), а также соответствующие антисмысловые олигонуклеотиды ("Синтол", Россия). Трансфекцию клеток полученными олигонуклеотидами проводили в течение 4 ч с использованием Metafectene ("Biontex Laboratories GmbH", Германия) при 37°C. Конечная концентрация siRNA составляла 50 нМ.

Для проведения иммуноблоттинга клетки на стадии формирования 80% монослоя снимали с чашек в 1 мл фосфатного буфера. Далее из полученных образцов выделяли клеточные экстракты для последующего электрофореза и иммуноблоттинга как описано ранее [17]. В работе использовали антитела к PAK1, ER α и α -tubulin ("Cell Signaling Technology", США).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы Origin 6. Во всех случаях статистические критерии считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Экспрессия PAK1 в клетках MCF-7 и HBL-100; влияние PAK1 на рост клеток.

Эксперименты проводили *in vitro* на клетках эстрогензависимого ER-позитивного рака молочной железы человека MCF-7 и эстрогеннезависимого ER-негативного рака молочной железы линии HBL-100. Определение уровня PAK1 методом иммуноблоттинга выявило его высокое содержание в клетках HBL-100 и существенно меньшее количество – в клетках MCF-7 (рис. 1а).

Для изучения роли PAK1 в регуляции пролиферации клетки MCF-7 и HBL-100 культивировали в присутствии IPA-3 в концентрации 10 мкМ/мл – специфического ингибитора PAK1, с последующим определением количества клеток как описано в Методах. Результаты показали, что IPA-3 приводит к торможению роста клеток, значительно более выраженному в клетках ER-негативной линии HBL-100 по сравнению с клетками MCF-7 (рис. 1б), что свидетельствует об активном участии PAK1 в поддержании эстрогеннезависимого роста клеток РМЖ.

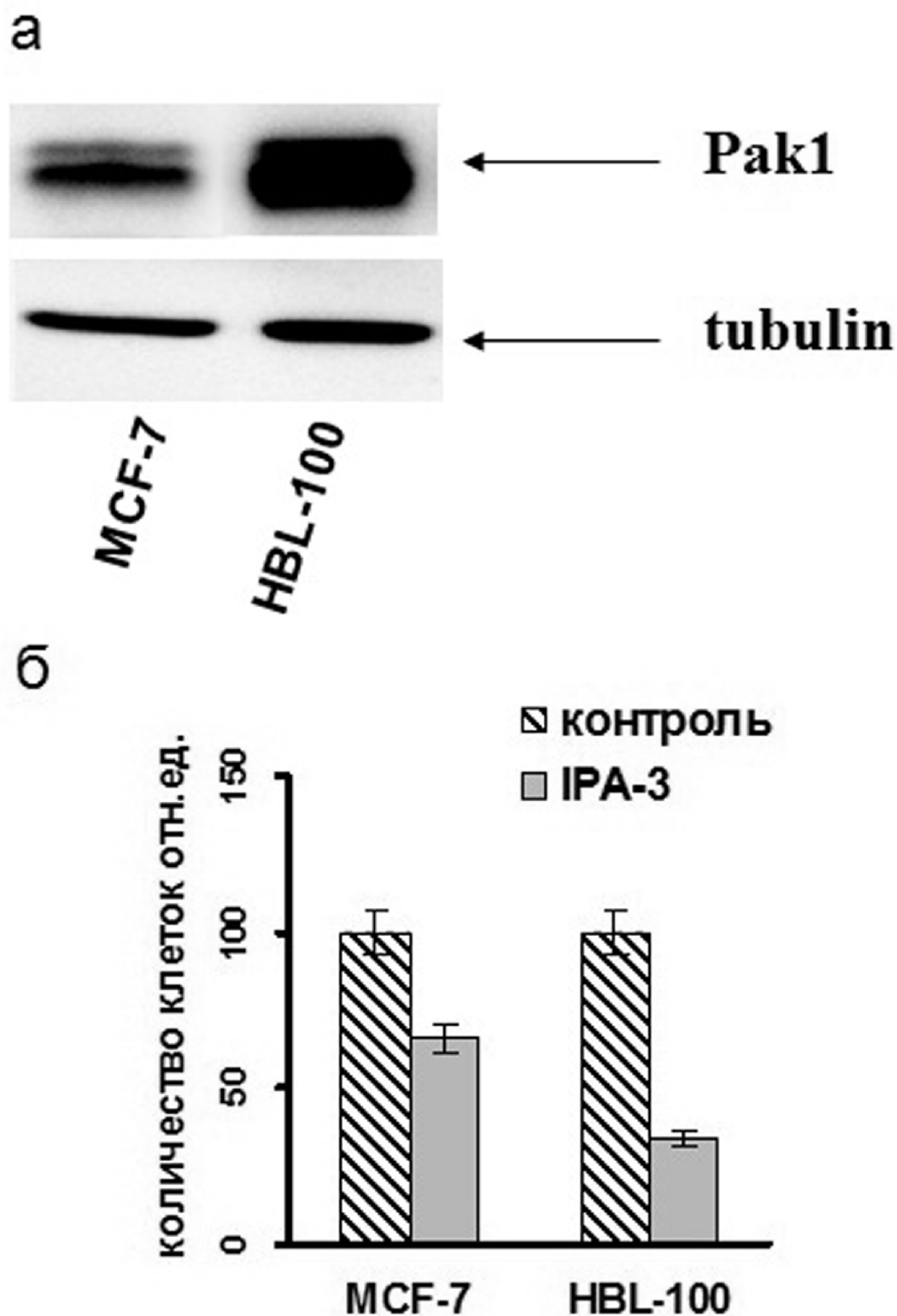


Рисунок 1.

Анализ экспрессии PAK1 с помощью иммуноблоттинга с антителами к PAK1 и α -тубулину (а) и влияния ингибитора PAK1 IPA-3 в концентрации 10 мкМ/мл на рост клеток MCF-7 и HBL-100 (б).

Влияние PAK1 на активность транскрипционных факторов AP-1, бета-катенина и Snail1.

Для дальнейшего изучения механизма рост-стимулирующих эффектов PAK1 был проведен анализ его действия на активность митогенных транскрипционных факторов: AP-1 и бета-катенина. Используя метод репортерного анализа, позволяющий оценить транскрипционную активность факторов по их способности взаимодействовать со специфическими участками связывания на ДНК и активировать экспрессию гена-репортера люциферазы, мы обнаружили, что гиперэкспрессия PAK1 в клетках приводит к выраженной стимуляции транскрипционной активности бета-катенина (рис. 2а) и AP-1 (рис. 2б), причем в обеих линиях клеток: MCF-7 и HBL-100.

Другая картина наблюдалась при изучении влияния PAK1 на активность Snail1 – транскрипционного белка-супрессора, подавляющего экспрессию эпителиальных маркеров и стимулирующего эпителиально-мезенхимальный переход клеток. Результаты репортерного анализа показали, что PAK1 стимулирует транскрипционную активность Snail1, определяемую по степени подавления экспрессии репортерного гена E-cad/Luc, но только в ER-негативных клетках HBL-100, тогда как в клетках MCF-7 активность Snail1 практически не менялась (рис. 2в).

PAK1 и ER; роль ER в регуляции Snail1.

Мы предположили, что причины нарушения передачи сигнала от PAK1 к Snail1 в клетках MCF-7 могут заключаться в существовании системы внутриклеточного сигналинга, ответственного за негативный контроль Snail1, и, что важно, активируемого при гиперэкспрессии PAK1 в ER-позитивных клетках. В пользу этого предположения свидетельствовали продемонстрированный нами ранее низкий уровень Snail1 в клетках MCF-7 [18], а также известные данные о способности ER подавлять активность Snail1 (через активацию специфического белка-супрессора Snail1 MTA3) [19, 20].

Мы установили, что ER действительно снижает активность Snail1 в клетках MCF-7. Как видно на рисунке 3а, активация ER вызывает снижение транскрипционной активности Snail1, а подавление ER в присутствии антиэстрогена тамоксифена сопровождается стимуляцией Snail1. В то же время, PAK1 позитивно регулирует ER: так, гиперэкспрессия PAK1 приводит к увеличению содержания и транскрипционной активности ER, тогда как подавление PAK1 под действием IPA-3 сопровождается снижением экспрессии и подавлением активности ER (рис. 3б,в). Блокирование ER в присутствии тамоксифена приводит к восстановлению способности PAK1 стимулировать Snail1 (рис. 4а), что позволяет рассматривать ER как PAK-зависимый фактор, сдерживающий активацию Snail1 в клетках MCF-7.

Значение Snail1 в поддержании эстрогеннезависимого роста клеток.

Для исследования участия Snail1 в регуляции клеточной пролиферации был применен метод малых интерферирующих РНК, позволяющий блокировать экспрессию Snail1 при трансфекции в клетки коротких фрагментов РНК. Мы показали, что подобный генетический нокдаун Snail1 приводит к значительному, более чем в 2 раза, снижению скорости роста ER-негативных клеток HBL-100, свидетельствуя о важной роли, которую играет Snail1 в регуляции роста таких клеток (рис. 4б).

Взяты вместе, представленные данные демонстрируют, что повышенная экспрессия PAK1 в клетках эстрогеннезависимого РМЖ является одним из факторов, поддерживающих рост ER-негативных опухолей; при этом в число эффекторов PAK1, участвующих в регуляции клеточной пролиферации, входит Snail1 – ключевой белок эпителиально-мезенхимального перехода.

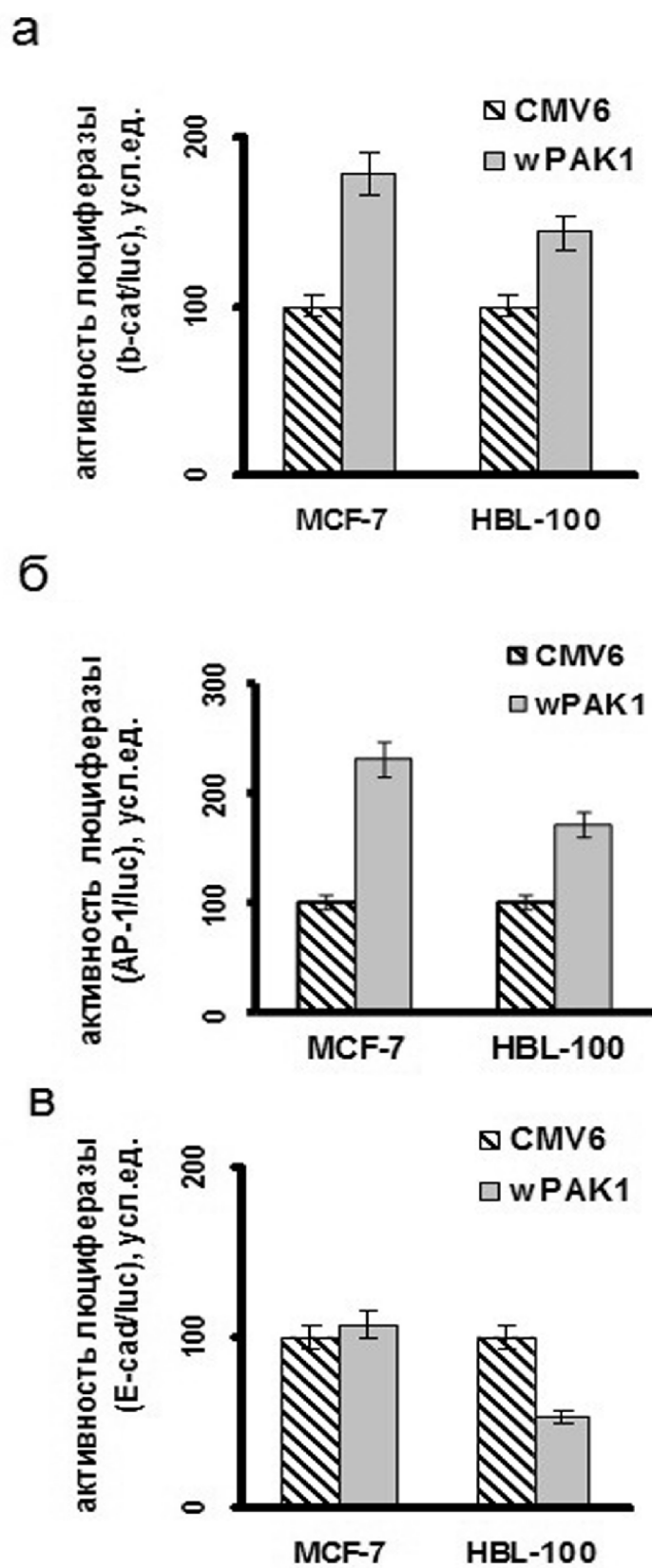


Рисунок 2.

Влияние трансфекции PAK1 на транскрипционную активность бета-катенина (а), AP-1 (б) и трансрепрессорную активность Snail1 в клетках MCF-7 и HBL-100 (в).

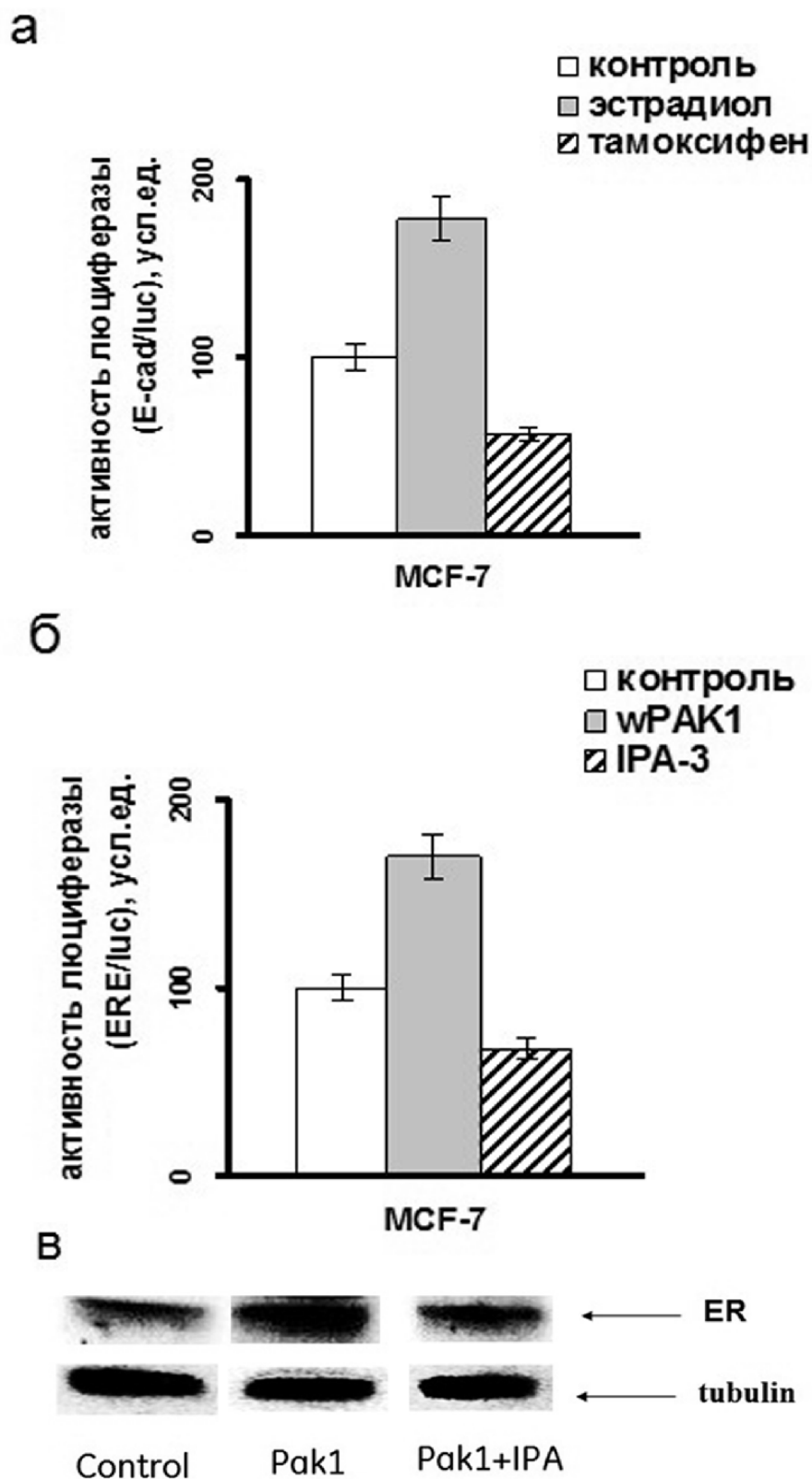


Рисунок 3.

Влияние эстрадиола и тамоксифена на транскрипторную активность Snail1 (а) в клетках MCF-7; анализ транскрипционной активности (б) и экспрессии (в) ER после трансфекции PAK1 или действия ингибитора PAK1 IPA-3 в клетках MCF-7.

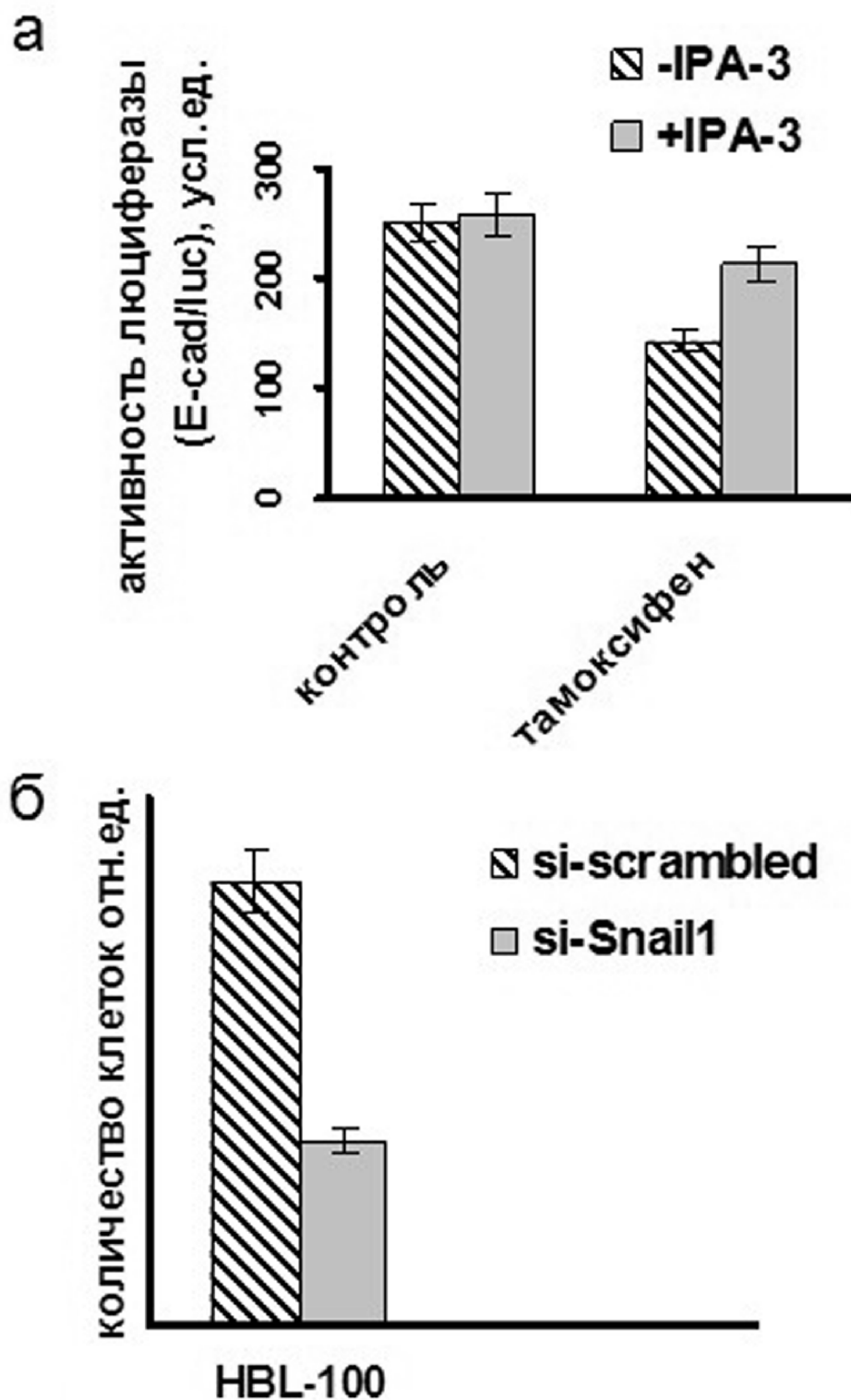


Рисунок 4.

Эффект комбинированного действия тамоксифена и IPA-3 на транскрипторную активность Snail1 в клетках MCF-7 (а); влияние трансфекции siRNA Snail1 на рост клеток HBL-100 (б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. При исследовании факторов, регулирующих развитие гормональной резистентности клеток рака молочной железы, продемонстрировано участие серин-треониновой протеинкиназы Pак1 в поддержании эстрогеннезависимого роста клеток. Установлено, что в клетках эстрогеннезависимого РМЖ PAK1 приводит к активации транскрипционного фактора Snail1, контролирующего эпителиально-мезенхимальный переход и, одновременно, обладающего выраженной митогенной активностью; показано участие Snail1 в стимуляции автономного роста клеток. В целом, полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования PAK1 и Snail1 в качестве маркеров развития гормональной резистентности РМЖ и потенциальных объектов таргетной терапии опухолей молочной железы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проекты № 14-04-00023 (эксперименты по исследованию PAK1), № 13-04-00284 (анализ Snail1) и РФФИ № 14-15-00362 (взаимодействие между PAK1, AP-1, бета-катенином и Snail1).

ЛИТЕРАТУРА

1. Красильников М.А. (2004) Вопросы онкологии, **50**, 399-405.
2. Normanno N., Di Maio M., De Maio E., De Luca A., de Matteis A. et al. (2005) Endocr. Relat. Cancer, **12**, 721-747.
3. Clarke R., Liu M.C., Bouker K.B., Gu Z., Lee R.Y. et al. (2003) Oncogene, **22**, 7316-7339.
4. Jordan V.C. (2003) Ann. Oncol., **14**, 969-970.
5. Jalava P., Kuopio T., Huovinen R., Laine J., Collan Y. (2005) Anticancer Res., **25**, 2535-2542.
6. Henderson B.E., Ponder B.A.J., Ross R.K. (2003) New York: Oxford University Press, **XIII**, 450, [454] of plates p.
7. Kichina J.V., Goc A., Al-Husein B., Somanath P.R., Kandel E.S. (2010) Expert Opin. Ther. Targets, **14**, 703-725.
8. Molli P.R., Li D.Q., Murray B.W., Rayala S.K., Kumar R. (2009) Oncogene, **28**, 2545-2555.
9. Ghosh A., Awasthi S., Peterson J.R., Hamburger A.W. (2013) Brit. J. Cancer, **108**, 557-563.
10. Kok M., Zwart W., Holm C., Fles R., Hauptmann M. et al. (2011) Breast Cancer Research and Treatment, **125**, 1-12.
11. Bostner J., Skoog L., Fornander T., Nordenskjold B., Stal O. (2010) Clinical Cancer Research, **16**, 1624-1633.
12. Arias-Romero L.E., Chernoff J. (2010) Small GTPases, **1**, 124-128.
13. Yang Y., Du J., Hu Z., Liu J., Tian Y. et al. (2011) J. Biomed. Res., **25**, 237-245.
14. Krasil'nikov M.A., Shatskaya V.A., Stavrovskaya A.A., Erohina M., Gershtein E.S. et al. (1999) Biochim. Biophys. Acta, **1450**, 434-443.
15. Reid G., Hubner M.R., Metivier R., Brand H., Denger S., et al. (2003) Mol. Cell, **11**, 695-707.
16. Vincent T., Neve E.P., Johnson J.R., Kukalev A., Rojo F., et al. (2009) Nat. Cell Biol., **11**, 943-950.
17. Lobanova Y.S., Scherbakov A.M., Shatskaya V.A., Evteev V.A., Krasil'nikov M.A. (2009) Mol. Cell Biochem., **324**, 65-71.
18. Scherbakov A.M., Andreeva O.E., Shatskaya V.A., Krasil'nikov M.A. (2012) J. Cellular Biochemistry, **113**, 2147-2155.

19. *Dhasarathy A., Kajita M., Wade P.A.* (2007) *Mol. Endocrinol.*, **21**, 2907-2918.
20. *Fujita N., Jaye D.L., Kajita M., Geigerman C., Moreno C.S., et al.* (2003) *Cell*, **113**, 207-219.
21. *Sells M.A., Knaus U.G., Bagrodia S., Ambrose D.M., Bokoch G.M., Chernoff J.* (1997) *Curr. Biol.*, **7**, 202-210.

Поступила: 25. 02. 2014.

**THE ROLE OF PROTEIN KINASE PAK1 IN THE REGULATION
OF ESTROGEN-INDEPENDENT GROWTH OF BREAST CANCER**

E.A. Avilova, O.E. Andreeva, V.A. Shatskaya, M.A. Krasilnikov

“N.N. Blokhin Russian Research Cancer Center”, Kashirskoye sh., 24, Moscow, 115478 Russia;
e-mail: k_avilova@mail.ru

The main goal of this work was to study the intracellular signaling pathways responsible for the development of hormone resistance and maintaining the autonomous growth of breast cancer cells. In particular, the role of PAK1 (p21-activated kinase 1), the key mitogenic signaling protein, in the development of cell resistance to estrogens was analyzed. *In vitro* studies were performed on cultured breast cancer cell lines: estrogen-dependent estrogen receptor (ER)-positive MCF-7 cells and estrogen-resistant ER-negative HBL-100 cells. We found that the resistant HBL-100 cells were characterized by a higher level of PAK1 and demonstrated PAK1 involvement in the maintaining of estrogen-independent cell growth. We have also shown PAK1 ability to up-regulate Snail1, one of the epithelial-mesenchymal transition proteins, and obtained experimental evidence for Snail1 importance in the regulation of cell proliferation.

In general, the results obtained in this study demonstrate involvement of PAK1 and Snail1 in the formation of estrogen-independent phenotype of breast cancer cells showing the potential role of both proteins as markers of hormone resistance of breast tumors.

Key words: breast cancer, estrogen receptors, PAK1, Snail1, resistance.