

УДК 577.24

©Коллектив авторов

РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ ИНТЕГРИНОМ $\alpha 5\beta 1$ И РЕЦЕПТОРОМ EGRF В СИГНАЛЬНЫХ ПУТЯХ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ ПРОЛИФЕРАЦИЮ И АПОПТОЗ КЛЕТОК MCF-7/Dox КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

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

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121 Москва, ул. Погодинская 10; тел./факс: (495) 7083806; эл. почта: 1938berman@gmail.com

Блокирование экспрессии интегрин $\alpha 5\beta 1$ и торможение активности рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) в линии MCF-7/Dox карциномы молочной железы человека сопровождаются значительным снижением скорости пролиферации клеток. Анализ митотического цикла показал, что снижение экспрессии $\alpha 5\beta 1$ приводило к задержке цикла в S фазе и сопровождалось существенным увеличением популяции апоптотических клеток (фракции суб-G₁). Ингибирование активности EGFR также приводило к задержке в S фазе, но без увеличения фракции суб-G₁. Блокирование $\alpha 5\beta 1$ и ингибирование EGFR приводило к уменьшению содержания активных (фосфорилированных) форм киназы фокального контакта FAK и Erk. Результаты показывают, что интегрин $\alpha 5\beta 1$ контролирует рост исследуемых клеток путём торможения их апоптотической гибели и путём активации EGFR.

Ключевые слова: интегрины, факторы роста, пролиферация клеток, онкогенез, сигнальные протеинкиназы

DOI 10.18097/PBMC20166203272

ВВЕДЕНИЕ

В многоклеточных организмах деление клеток находится под контролем клеточного окружения – растворимых молекул (в основном факторов роста, но также гормонов, фосфолипидов и др.) и молекул, входящих в состав “твёрдого” субстрата, внеклеточного матрикса. Каждая из этих молекул выполняет функции лиганда, который при взаимодействии со специфическим рецептором клеточной мембраны генерирует сигнал к клеточному ядру. В его проведении участвуют различные компоненты, формирующие так называемые сигнальные каскады. Часто в проведение сигнала (сигналинг) вовлечены онкобелки [1-3].

Большинство рецепторов ростовых факторов являются тирозиновыми протеинкиназами. Рецепторы белков матрикса представлены интегринными, которые каталитической активностью не обладают [4, 5]. Нарушения сигналинга, обусловленные модификациями факторов роста, интегринных или сигнальных белков, могут приводить к неконтролируемой клеточной пролиферации, лежащей в основе опухолевого роста [5-8].

Большинство интегринных обладает множественной лигандной специфичностью, результатом которой является способность разных рецепторов взаимодействовать с одним белком матрикса и продуцировать одинаковые сигналы [4, 9, 10]. Это затрудняет изучение свойств отдельных интегринных. Единственным рецептором, обладающим уникальной специфичностью, является фибронектин-связывающий интегрин $\alpha 5\beta 1$. Сведения об участии этого рецептора в механизмах пролиферации неоднозначны. Наряду с ингибирующим действием $\alpha 5\beta 1$ на клеточную пролиферацию и онкогенез в ряде исследований продемонстрирована его способность стимулировать митогенную активность клеток [10-14].

Известно, что в контроле митотической активности клеток существует синергизм между интегринными рецепторами и рецепторами факторов роста. Однако в различных клеточных линиях для пролиферации необходимы разные сочетания этих рецепторов [6, 15]. Выявлена зависимость между действием интегрин $\alpha 5\beta 1$ на пролиферацию и свойствами образуемых им комплексов с другими макромолекулами. Эти комплексы и их свойства могут быть очень специфичны для отдельных типов клеток [7, 10].

Из сказанного вытекает важность изучения сигнальных механизмов, которые определяют рецептор-опосредуемую митогенную активность в конкретных типах клеток.

В настоящей работе на модели линии MCF-7/Dox карциномы молочной железы человека исследовано участие интегрин $\alpha 5\beta 1$ и рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) в сигнальных механизмах, контролирующих клеточную пролиферацию и апоптотическую гибель клеток. Результаты работы показывают, что в опухолевых клетках исследуемой линии $\alpha 5\beta 1$ участвует в механизмах их пролиферации и апоптотической гибели, в то время как EGFR контролирует пролиферацию, но не апоптоз.

МЕТОДИКА

Клетки и реагенты

Линия MCF-7/Dox, любезно предоставленная профессором А.А. Штилем (Российский онкологический центр, Москва), является производной линии MCF-7 клеток карциномы молочной железы человека. Она получена путём селекции родительских клеток, выживших в присутствии доксорубина, и обладает на порядок более высокой резистентностью к противоопухолевым

* - адресат для переписки

препаратам доксорубину и винкристину. Линия A431 клеток эпидермоидной карциномы человека получена в банке ATCC (США). Клетки обеих линий культивировали в среде DMEM, содержащей 10% сыворотку эмбрионов коров, 2 mM L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Во всех экспериментах использовали клетки в логарифмической фазе роста. За исключением особо оговоренных случаев в работе использовали реагенты фирмы "Sigma" (США), поликлональные антитела к $\alpha 5$ интегринавой субъединице ("Chemicon", США), к протеинкиназам FAK, Akt, Erk ("Cell Signaling Tech", США), ингибитор EGFR – соединение PD168393, ингибитор MAP киназы – соединение PD98059 ("Calbiochem", США), ингибитор Akt киназы – соединение LY294002 ("Sigma").

Трансфекция siRNA

Трансфекцию siRNA осуществляли как описано ранее [16]. Клетки трансфицировали контрольной siRNA или $\alpha 5$ -специфической siRNA, инкубировали 24 ч в среде, содержащей 0,5% сыворотку, и пассировали в 48-луночные планшеты [(10-20)×10³ клеток в лунку]. Эффективность трансфекции оценивали по содержанию $\alpha 5$ -интегрин в клеточном лизате, которое определяли с помощью электрофореза в Ds-Na-ПААГ и иммуноблотинга. Как правило, содержание $\alpha 5$ -интегрин в лизате клеток, обработанных $\alpha 5$ siRNA, снижалось в 2-2,5 раза по сравнению с клетками, обработанными контрольной siRNA (данные не приведены).

Лентивирусные shRNA конструкции и инфицирование клеток

Бактериальные глицириновые клоны, содержащие лентивирусный плазмидный вектор pLKO.1-puro с shRNA для $\alpha 5$ -интегрина субъединицы, были куплены у фирмы "Sigma". Продукцию лентивирусных частиц в клетках HEK293T и инфицирование MCF-7/Dox проводили, как описано ранее [17]. Уровень снижения экспрессии $\alpha 5$ -интегрин составлял 70-80% и был примерно одинаковым для двух использованных клонов (данные не приведены).

Пролиферация клеток

Клетки инкубировали в среде, содержащей 0,5% сыворотку крови, в течение 24 ч, после чего пассировали в 48-луночные планшеты [(1-2)×10⁴ клеток в лунку] и выращивали в полной среде в течение 24 ч или 48 ч. Затем клетки собирали в планшет с обработкой смесью трипсин-ЭДТА и определяли их количество с помощью МТТ-теста [19]. Для определения действия ингибиторов к клеткам в среде, содержащей 10% сыворотку крови, добавляли растворы LY294002 или PD98059 в ДМСО (конечные концентрации 50 мкМ) или PD168393 в ДМСО (1-5 мкМ); конечная концентрация ДМСО не превышала 0,5%. Контрольные пробы содержали 0,5% ДМСО. Клетки инкубировали в течение 10 мин. при комнатной температуре, после чего инкубировали

в полной среде при 37°C в течение 24 ч или 48 ч и обрабатывали, как описано выше.

Цитофлуориметрия

Клетки [(3-5)×10⁵] фиксировали в 70% этаноле, промывали фосфатно-солевым буфером, добавляли 1 мл раствора пропидия иодида (50 мкг/мл) в цитратном буфере и 50 мкл раствора РНКазы А (10 мкг/мл) и инкубировали 3 ч при 4°C. Анализ проводили на приборе Calibur ("Becton Dickinson", США).

Определение субстрат-зависимого апоптоза.

Индукцию и количественное определение субстрат-зависимого апоптоза (аноикоза) осуществляли, как описано нами ранее [18]. Клетки, меченные ³H-тимидином, инкубировали в течение 24 ч в среде DMEM, содержащей 10% сыворотку, на неадгезивном субстрате – полигидроксиэтилметакрилате (поли-ГЭМ). Затем измеряли радиоактивность продуктов деградации ДНК (фракция, не осаждающаяся ТХУ) и радиоактивность интактной ДНК, которая осаждается ТХУ. Величину субстрат-зависимого апоптоза рассчитывали, используя следующую формулу: Аноикоз (%) = радиоактивность не осаждающейся ДНК/радиоактивность осаждающейся ДНК + радиоактивность не осаждающейся ДНК.

Электрофорез в ПААГ и иммуноблотинг

Клетки лизировали 50 mM Трис-HCl буфером, pH 7,5, содержащим 1% Тритон X-100, 150 mM NaCl, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% DS-Na, а также смесь ингибиторов протеаз и фосфатаз ("Santa Cruz Biotech", США) из расчёта 1 мкл каждой на 10⁶ клеток и центрифугировали 10 мин при 13000 g. Белки клеточного лизата (30 мкг) разделяли с помощью электрофореза в Ds-Na-ПААГ и подвергали электропереносу на мембрану из поливинилиденфторида. После инкубации с первыми антителами мембрану обрабатывали вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой, проявляли в системе ECL (Enhanced Chemoluminescence, "Amersham", Великобритания), экспонировали с рентгеновской плёнкой и сканировали.

Статистический анализ

Различия между группами оценивали с помощью t-теста Стьюдента. Различия считались достоверными при p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ингибирование экспрессии $\alpha 5 \beta 1$ тормозит пролиферацию клеток MCF-7/Dox

Ранее нами было показано, что клетки MCF-7/Dox характеризуются высоким уровнем инвазии *in vitro* [19]. Их инвазивная активность резко снижалась после трансфицирования siRNA, специфической для $\alpha 5$ -субъединицы, и последующего блокирования экспрессии интегрин $\alpha 5 \beta 1$ на клеточной поверхности [19]. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли данного рецептора в инвазивном

фенотипе исследуемых клеток. Представлялось интересным выяснить, зависит ли пролиферативная активность MCF-7/Dox от экспрессии $\alpha 5\beta 1$. С этой целью исследовали рост клеток, трансфицированных $\alpha 5$ -интегриновой siRNA, в сравнении с клетками, трансфицированными контрольной siRNA.

Результаты, представленные на рисунке 1а, показывают, что блокирование экспрессии $\alpha 5\beta 1$ сопровождается снижением роста трансфицированных клеток, относительно контрольных клеток, на 40-60% в течение 24 ч после пассирования. Снижение роста, вызванное блокированием $\alpha 5\beta 1$, выражено в меньшей степени при более плотном посеве клеток на субстрат.

При исследовании динамики пролиферации клеток в течение 48 ч, выяснилось, что наиболее четкие различия между контрольными и опытными клетками обнаруживаются в течение первых 24 ч, а затем они выражены в меньшей степени (рис. 1б). Это наблюдение можно объяснить относительно небольшим периодом полужизни siRNA и высокой скоростью пролиферации (числа удвоений) исследуемых клеток.

Сходство между EGFR и $\alpha 5\beta 1$ в эффекте, оказываемом на пролиферацию клеток MCF-7/Dox

Синергизм между рецепторами факторов роста (в частности EGFR) и интегринными в регулировании митотической активности клеток описан в ряде работ [6, 10, 15]. Для анализа возможных механизмов взаимовлияния этих рецепторов в настоящей работе проведен сравнительный анализ влияния блокировки сигнальной активности $\alpha 5\beta 1$ и EGFR на пролиферацию клеток MCF-7/Dox. Киназную активность EGFR блокировали путём инкубации клеток со специфическим ингибитором – соединением PD168393. При тестировании различных концентраций этого соединения выяснилось, что степень ингибирования клеточной пролиферации в стандартных условиях культуры (плотность клеток при пассировании, 24 ч инкубации) не изменяется в пределах 2-10 мкМ (данные не приведены). В качестве рабочей была выбрана концентрация 5 мкМ.

Сравнение данных, представленных на рисунке 1, показывает, что блокирование сигнальной активности рецептора $\alpha 5\beta 1$ (рис. 1б) или EGFR (рис. 1в) оказывало сходное по динамике и интенсивности действие на пролиферацию исследуемых клеток.

Для характеристики изменений фаз митотического цикла клеток при торможении их пролиферативной активности был проведен цитофлуориметрический анализ распределения клеток по фазам цикла. В этих опытах блокирование экспрессии интегрин $\alpha 5\beta 1$ осуществляли путем заражения клеток лентивирусом с плазмидным вектором, экспрессирующим shRNA и ген устойчивости к пуromицину, с последующим отбором по устойчивости к антибиотику.

Данные, представленные на рисунке 2, показывают, что в линии MCF-7/Dox, наряду с диплоидными клетками, обнаруживается значительная по размеру популяция анеуплоидных клеток, а содержание апоптотических клеток не превышает 2-3%.

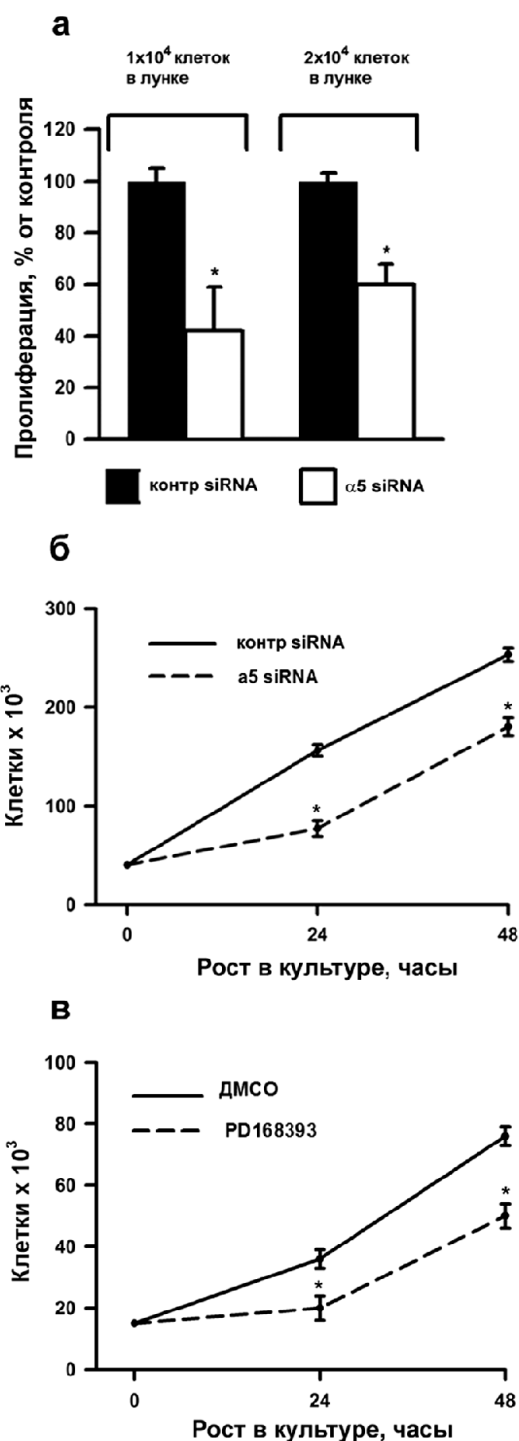


Рисунок 1. Влияние блокирования экспрессии интегрин $\alpha 5\beta 1$ (а,б) или ингибирования EGFR (в) в клетках MCF-7/Dox на их пролиферацию. (а,б) клетки трансфицировали контрольной или $\alpha 5$ -специфической siRNA, после чего определяли пролиферацию, как описано в “Методах исследования”; а) количество клеток, трансфицированных контрольной siRNA, принято за 100%; в) клетки инкубировали в присутствии PD1683931 или 0,5% ДМСО и определяли пролиферацию, как описано в разделе “Методика”. Представлены результаты трёх независимых опытов (средняя \pm стандартная ошибка средней). * - $p < 0,05$ относительно клеток, трансфицированных контрольной siRNA (а,б), или относительно проб, содержащих только ДМСО (в).

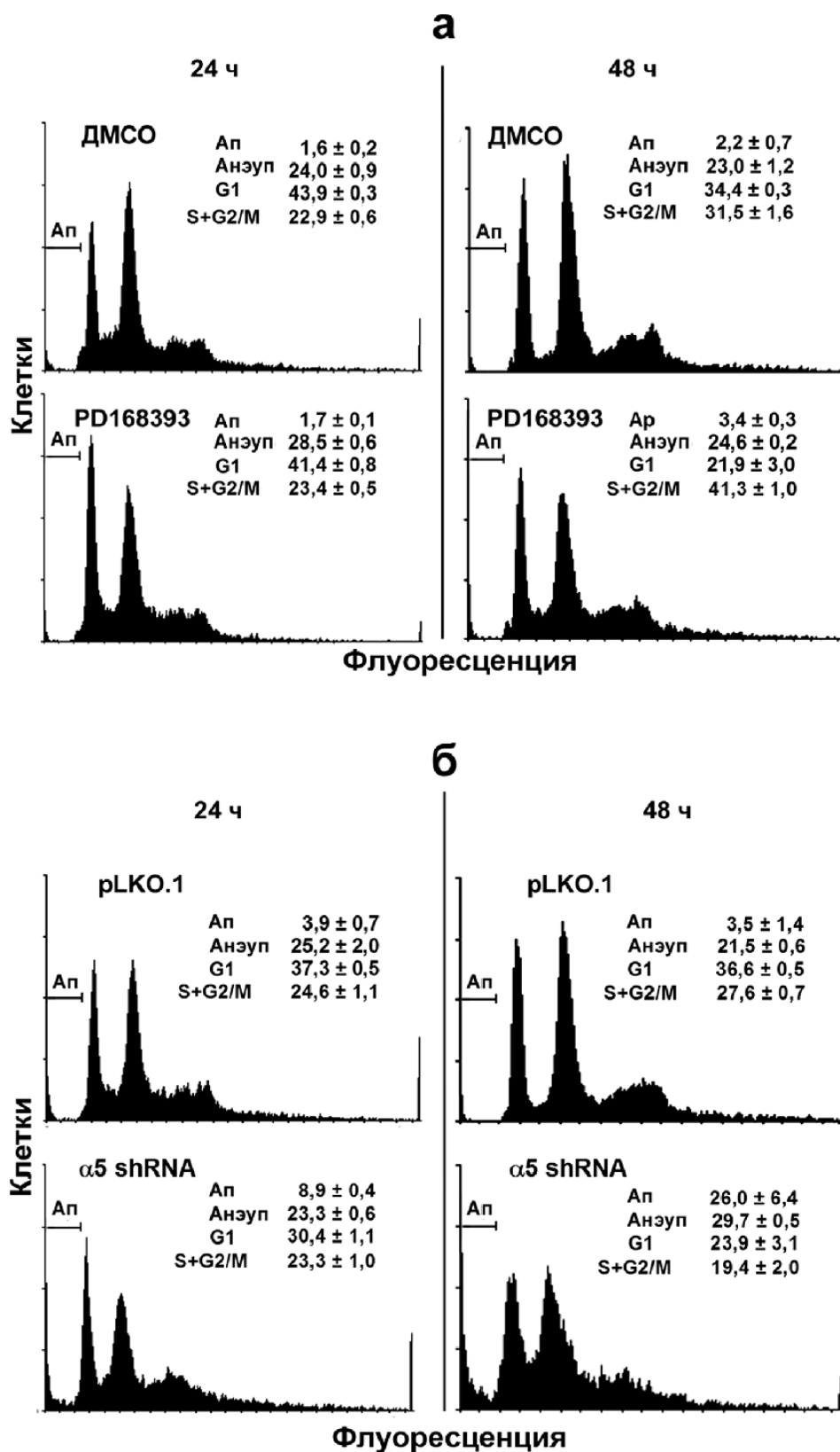


Рисунок 2. Влияние блокирования экспрессии интегрина $\alpha 5 \beta 1$ или ингибирования EGFR в клетках MCF-7Dox на митотический цикл. а) клетки инкубировали 24 ч или 48 ч в присутствии PD168393 или 0,5% ДМСО, фиксировали в этаноле, окрашивали йодидом пропидия и анализировали в цитофлуориметре, как описано в разделе “Методика”; б) клетки инфицировали лентивирусом с плазмидным вектором pLKO.1, содержащим $\alpha 5$ -специфическую shRNA, или “пустым” вектором, как описано ранее [17], после чего клетки пассировали в течение указанного времени и обрабатывали для цитофлуориметрии; Ап-апоптотические (суб-G₁) клетки; Анэуп - анеуплоидные клетки; цифры представляют относительное содержание (%) каждой популяции. Представлены результаты типичного опыта.

При обработке ингибитором EGFR содержание апоптотических и анеуплоидных клеток не изменяется (рис. 2а) Через 24 ч роста в культуре существенные различия в распределении по фазам между контрольными и опытными клетками не выявляются. Это свидетельствует о том, что обнаруживаемое в течение 24 ч снижение роста клеток, обработанных ингибитором EGFR, не связано с изменениями в фазах цикла, а, по-видимому, обусловлено увеличением интервала между циклами. Однако через 48 ч роста в культуре видны изменения, характерные для задержки цикла в S-фазе: уменьшение и расширение пика G_1 и увеличение содержания клеток в фазах S+ G_2 /M. Важно отметить, что независимо от времени роста в культуре, относительное содержание фракции суб- G_1 , представленной апоптотическими клетками, в контрольных и опытных культурах не превышает 3%.

При торможении экспрессии интегрин $\alpha 5\beta 1$ (рис. 2б) уже через 24 ч наблюдается уменьшение популяции клеток в фазе G_1 , которое более чётко проявляется через 48 ч, что свидетельствует о задержке прохождения через S фазу. В то же время для этих клеток характерно снижение фракций S и G_2 /M через 24 ч при более чем двукратном увеличении популяции апоптотических клеток, а через 48 ч содержание этой популяции было в 7 раз выше, чем в контроле. Таким образом, отличие торможения пролиферации, индуцированной подавлением экспрессии интегрин $\alpha 5\beta 1$, от торможения, вызываемого ингибированием активности EGFR, заключается в задержке цикла в S фазе и выраженной апоптотической гибели клеток.

Представленные результаты согласуются с данными наших исследований, проведённых на линии A431 эпидермоидной карциномы человека, которые показали, что блокирование экспрессии интегрин $\alpha 5\beta 1$ и торможение активности EGFR в клетках A431 оказывают очень близкий по динамике и интенсивности ингибирующий эффект на их пролиферацию [17]. Отличие между исследованными линиями заключалось в том, что в клетках A431 ингибирование EGFR приводило к задержке цикла в фазе G_0/G_1 , тогда как в клетках MCF-7/Dox торможение наблюдалось в S фазе. В то же время, в клетках линии A431, как и в клетках MCF-7/Dox, блокирование экспрессии $\alpha 5\beta 1$ существенно усиливало апоптоз, который не наблюдали при ингибировании активности EGFR.

Приведённые данные об усилении апоптоза при ингибировании экспрессии интегрин $\alpha 5\beta 1$ были получены в условиях, когда связь клеток с субстратом не была нарушена. Ранее нами было показано, что блокирование экспрессии $\alpha 5\beta 1$ в клетках MCF-7/Dox в значительной мере усиливает их субстрат-зависимый апоптоз (аноикоз) [20]. Аналогичное исследование, проведённое на клетках A431, показало, что снижение уровня интегрин $\alpha 5\beta 1$ примерно в 2 раза усиливает гибель клеток, культивируемых на неадгезивном субстрате в течение 24 ч, (данные не приведены).

Сигнальные пути, опосредующие эффекты блокирования интегрин $\alpha 5\beta 1$ и EGFR

Выявленное сходство в эффектах, оказываемых торможением исследуемых рецепторов, свидетельствует об общности отдельных звеньев их сигнальных путей. Для подтверждения этого предположения исследовали влияние блокирования активности $\alpha 5\beta 1$ и EGFR на экспрессию сигнальных молекул, контролирующих пролиферацию клеток.

Из рисунка 3 видно, что блокирование интегрин $\alpha 5\beta 1$ и EGFR не оказывают заметного влияния на экспрессию киназы фокального контакта FAK, но резко снижают содержание её активной (фосфорилированной) формы. Киназа FAK вовлечена в один из ранних этапов инициированных интегринными сигнальных путей [4, 5]. В активных участках (фокальных контактах) клеточной мембраны она локализована вблизи интегринов и, по косвенным данным, образует ассоциаты с этими рецепторами [4, 5].

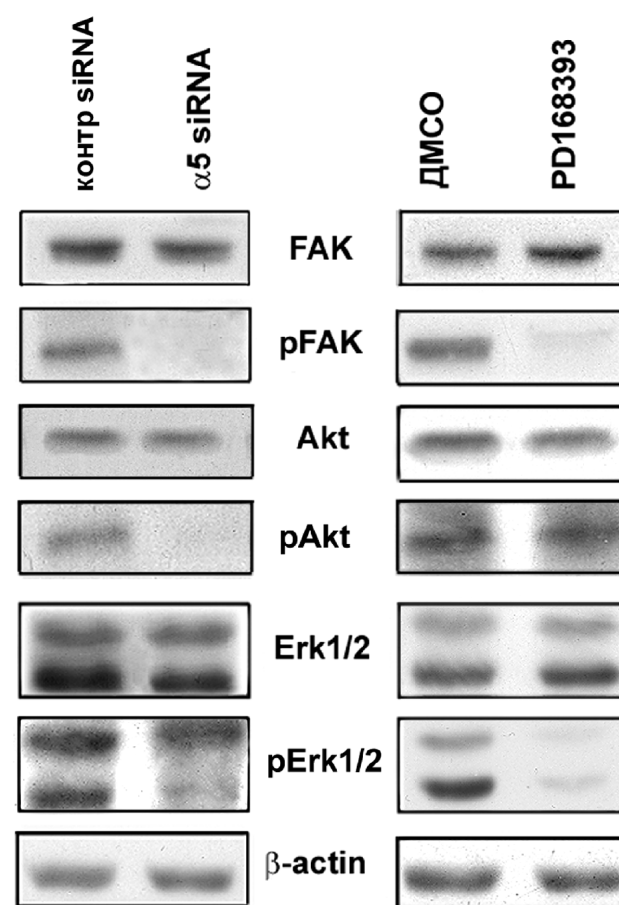


Рисунок 3. Влияние блокирования экспрессии интегрин $\alpha 5\beta 1$ или ингибирования EGFR в клетках MCF-7/Dox на экспрессию и активность сигнальных протеинкиназ. Клетки трансфицировали контрольной siRNA или $\alpha 5$ siRNA (см. “Методы исследования”), лизировали, и белки лизата анализировали с помощью электрофореза в ПААГ и иммуноблотинга, как описано в разделе “Методика”. Представлен типичный препарат.

Тот факт, что ингибирование обоих рецепторов сопровождается резким снижением активной формы FAK, свидетельствует о её участии на ранних стадиях взаимного влияния интегрин $\alpha 5\beta 1$ и EGFR на внутриклеточные процессы.

В цепи клеточных сигналов, инициируемых интегринами, важную роль играют протеинкиназы PI-3K/Akt и представители семейства MAP (митогенактивируемые протеинкиназы, в частности Erk). Ранее нами было показано, что ингибирование экспрессии $\alpha 5\beta 1$ в клетках MCF-7/Dox сопровождается существенным снижением активности Akt и киназы Erk2, но не влияет на их содержание в лизате [19]. Этот результат подтвердился в настоящей работе (рис. 3). В то же время выяснилось, что торможение активности EGFR не влияет на содержание в клеточном лизате Akt, однако резко снижает содержание активных форм Erk1 и Erk2 (рис. 3).

Чтобы установить, отражают ли эти изменения участие указанных фосфокиназ в митогенной активности интегрин $\alpha 5\beta 1$ и EGFR, мы исследовали влияние ингибитора фосфокиназы Akt – соединения LY294002 и ингибитора MAP киназ – соединения PD98059 на пролиферацию исследуемых клеток. Оказалось, что указанные ингибиторы в концентрации 25 мкМ тормозят клеточную пролиферацию на 40-50% (данные не приведены).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные о роли интегрин $\alpha 5\beta 1$ в пролиферации нормальных и опухолевых клеток противоречивы [10-14]. Результаты настоящей работы согласуются со сведениями, свидетельствующими о стимулировании интегрин $\alpha 5\beta 1$ митогенной активности клеток. Показано, что пролиферирующие клетки сетчатки глаза существенно активнее в экспрессии $\alpha 5\beta 1$, чем в состоянии покоя [13]. Стимуляция $\alpha 5\beta 1$ субстратом (фибронектином) усиливает пролиферацию растущих в культуре клеток эндотелия лимфатических сосудов [14]. Вместе с тем в ряде исследований было продемонстрировано антипролиферативное действие интегрин $\alpha 5\beta 1$. Так, гиперэкспрессия $\alpha 5\beta 1$ в клетках рака толстого кишечника с исходно низким уровнем его экспрессии приводит к резкому снижению их опухолевой активности [10]. Samandari и соавт. обнаружили, что ингибирующее действие токоферола на пролиферацию клеток глиомы обусловлено повышенной экспрессией интегрин $\alpha 5\beta 1$ [11]. В клетках карциномы желудка транскрипционный фактор HIF-1 блокирует субстрат-зависимый апоптоз и усиливает рост клеток в полужидком агаре путём подавления экспрессии $\alpha 5\beta 1$ [12].

Причиной указанных противоречий являются, по-видимому, индивидуальные особенности $\alpha 5\beta 1$ -зависимого сигналинга в конкретных клеточных линиях. Однако число работ, посвященных детальной характеристике сигнальных путей $\alpha 5\beta 1$, как и других интегринов, в клетках разных типов, невелико.

Важную роль в механизмах, контролирующих пролиферацию клеток с участием интегринов,

играет их влияние на рецепторы факторов роста. Так, показано, что взаимодействие между интегринами, в том числе $\alpha 5\beta 1$, с указанными рецепторами и их активация может происходить как в присутствии, так и отсутствии факторов роста – лигандов и активаторов этих рецепторов [21]. В линии Caco-2 клеток рака толстого кишечника, не экспрессирующих $\alpha 5\beta 1$, трансфекция $\alpha 5$ -кДНК инициировала пролиферацию, которая тормозилась антителами, блокирующими активность EGFR [22]. Эти результаты согласуются с нашими данными, которые показали, что торможение сигнальной активности интегрин $\alpha 5\beta 1$ и EGFR приводит к заметному уменьшению активных форм киназ FAK и Erk, которые играют ключевую роль в механизмах пролиферации.

Другой механизм участия $\alpha 5\beta 1$ в клеточном росте может быть связан с усилением апоптотической гибели клеток в ответ на блокирование экспрессии $\alpha 5\beta 1$ (рис. 2). Скорее всего, сигнальные пути этого рецептора могут контролировать рост клеточной популяции путем торможения апоптотической гибели клеток, в то время как EGFR-инициируемый сигналинг в указанных линиях к регуляции апоптоза не имеет отношения. Следует, однако, отметить, что сведения о роли интегринов, в том числе $\alpha 5\beta 1$, в регуляции апоптоза неоднозначны, и в ряде исследований описано как блокирующее, так и стимулирующее клеточную гибель действие указанного рецептора [12, 23].

Возможное объяснение этих различий состоит в разном влиянии, которое $\alpha 5\beta 1$ и EGFR оказывают на активность фосфокиназы Akt – ключевого посредника в проведении сигналов, контролирующей гибель клеток [24, 25]. Данные, представленные на рисунке 3, показывают, что ответом клеток на подавление экспрессии $\alpha 5\beta 1$ является резкое снижение содержания активной формы этой киназы, в то время как обработка клеток ингибитором EGFR на содержание Akt не влияла. В пользу высказанного предположения свидетельствует тот факт, что при отсутствии сыворотки крови в культуральной среде ингибирование Akt в эндотелиальных клетках блокировало антиапоптотический эффект $\alpha 5\beta 1$, в то время как ингибирование MAP киназы не влияло на действие интегрин [14].

В заключение, представленные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что влияние интегрин $\alpha 5\beta 1$ на пролиферацию обусловлено двумя сигнальными механизмами, инициируемыми этим рецептором. Один из них контролирует апоптотическую гибель клеток, а другой – через взаимодействие и активацию рецепторов факторов роста – участвует в механизмах митогенеза.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы по теме “Создание клеточных моделей молекулярных процессов в органах и тканях” (НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича) и поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты 14-04-00783 и 15-04-05511).

ЛИТЕРАТУРА

1. Howe A.K., Aplin A.E., Juliano R.L. (2002) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **12**, 30-35.
2. Lee J.W., Juliano R. (2004) *Mol. Cells*, **17**, 188-202.
3. Hynes N.E., Lane H.A. (2005) *Nature Rev. Cancer*, **5**, 341-354.
4. Hynes R.O. (2002) *Cell*, **110**, 673-687.
5. Hehlhans S., Haase M., Cordes N. (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, **1775**, 163-180.
6. Brakebusch C., Bouvard D., Stanchi F., Sakai T., Fassler R. (2002) *J. Clin. Invest.*, **109**, 999-1006.
7. Ranganathan A.C., Adam A.P., Aguirre-Ghiso J.A. (2006) *Cell Cycle*, **5**, 1799-1807.
8. Di Nicolantonio F.D., Bardelli A. (2006) *Curr. Opin. Oncol.*, **18**, 69-76.
9. Flier A., Sonnenberg A. (2001) *Cell Tissue Res.*, **305**, 285-298.
10. Kuwada S.K., Kuang J., Li X. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 19027-19035.
11. Samandari E., Visarius T., Zingg J.M., Azzi A. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **342**, 1329-1333.
12. Rohwer N., Welzel W., Daskalov K., Pfander D., Wiedenmann B., Detjen K., Cramer T. (2008) *Cancer Res.*, **68**, 10113-10120.
13. Proulx S., Guérin S.L., Salesse C. (2003) *Mol. Vis.*, **9**, 473-481.
14. Zhang X., Groopman J.E., Wang J.F. (2005) *J. Cell. Physiol.*, **202**, 205-214.
15. Roovers K., Assoian R.K. (2000) *Bioessay*, **22**, 818-826.
16. Морозевич Г.Е., Козлова Н.И., Чеглаков И.Б., Ушакова Н.А., Преображенская М.Е., Берман А.Е. (2008) *Биохимия*, **73**, 981-988.
17. Morozovich G.E., Kozlova N.I., Ushakova N.A., Probrazhenskaya M.E., Berman A.E. (2012) *Aging*, **4**, 368-374.
18. 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.
19. Morozovich G.E., Kozlova N.I., Cheglakov I.B., Ushakova N.A., Berman A.E. (2009) *Cell Cycle*, **8**, 2219-2225.
20. Морозевич Г.Е., Козлова Н.И., Ушакова Н.А., Преображенская М.Е., Берман А.Е. (2011) *Биомед. химия*, **57**, 77-84.
21. Yamada K.M., Even-Ram S. (2002) *Nat. Cell Biol.*, **4**, E75-76.
22. Kuwada S.K., Li X. (2000) *Mol. Biol. Cell*, **11**, 2485-2496.
23. Haenssen K.K., Caldwell S.A., Shahriari K.S., Jackson S.R., Whelan K.A., Klein-Szanto A.J., Reginato M.J. (2010) *J. Cell Sci.*, **123**, 1373-1382.
24. Yoganathan N., Yee A., Zhang Z., Leung D., Yan J., Fazli L., Kojic D.L., Costello P.C., Jabali M., Dedhar S., Sanghera J. (2002) *Pharmacol. Ther.*, **93**, 233-242.
25. Verma A., Mehta K. (2007) *Drug Resist. Updat.*, **10**, 144-151.

Поступила: 08. 10. 2015.
Принята к печати: 10. 01. 2016.

IMPLICATION OF INTEGRIN $\alpha 5 \beta 1$ SIGNAL PATHWAYS IN PROLIFERATION AND APOPTOSIS OF MCF-7/Dox HUMAN BREAST CARCINOMA CELLS

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

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; tel./fax: (495)7083806; e-mail: 1938berman@gmail.com

In MCF-7/Dox human breast carcinoma cells, down-regulation of integrin $\alpha 5 \beta 1$ and inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) markedly reduced rates of cell proliferation. Mitotic cycle analysis showed that $\alpha 5 \beta 1$ down-regulation resulted in cell cycle arrest at the S phase, followed by a significant increase in the population of apoptotic cells (subG1 population). Inhibition of EGFR activity also caused cell cycle arrest at the S-phase but without any increase in the subG1 population. Down-regulation of $\alpha 5 \beta 1$ and EGFR inhibition resulted in a significant decrease of cell content of the active (phosphorylated) forms of FAK and Erk protein kinases. The data obtained suggest that $\alpha 5 \beta 1$ integrin is implicated in cell growth control via inhibition of apoptotic cell death and through EGFR activation.

Key words: integrins, cell proliferation, oncogenesis, growth factors, signaling