

©Коллектив авторов

СИГНАЛИНГ ИНТЕГРИНА $\alpha 3\beta 1$ В РЕГУЛИРОВАНИИ СТАРЕНИЯ КЛЕТОК SK-MEL-147 МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА

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

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *эл.почта: 1938berman@gmail.com

На клетках линии SK-Mel-147 меланомы человека показано, что блокирование экспрессии интегрин $\alpha 3\beta 1$ путём трансдукции клеток $\alpha 3$ -специфической shRNA не влияло на их пролиферацию, но резко увеличивало содержание SA- β -Gal-положительных клеток — фенотипического признака клеточного старения. Эти изменения сопровождались существенным увеличением активности протеинкиназ Akt и mTOR и экспрессии онкосупрессоров p53 и p21. Фармакологическое ингибирование mTORC1 снижало содержание SA- β -Gal положительных клеток в популяции SK-Mel-147 клеток, дефицитных по $\alpha 3\beta 1$. Основываясь на ранее полученных нами данных о неканонической функции изомеров Akt в регулировании старения клеток SK-Mel-147, вызванного дефицитом интегрин $\alpha 2\beta 1$, исследовали роль Akt изомеров в старении, индуцированном супрессией $\alpha 3\beta 1$. Оказалось, что в клеточной популяции с блокированной экспрессией этого рецептора ингибирование Akt1 снижает содержание SA- β -Gal положительных клеток до уровня контрольной популяции, в то время как ингибирование Akt2 не имело заметного эффекта. Полученные данные демонстрируют, что: (i) ламинин-специфический интегрин $\alpha 3\beta 1$, как и коллаген-специфический рецептор $\alpha 2\beta 1$, участвует в защите опухолевых клеток от старения, (ii) в основе старения, индуцированного супрессией $\alpha 3\beta 1$, также лежит сигнальный механизм, в котором Akt1 выполняет неканоническую функцию.

Ключевые слова: прогрессия опухолей; клеточное старение; интегрины; сигналинг; неканоническая активность протеинкиназы Akt

DOI: 10.18097/PBMC20226801039

ВВЕДЕНИЕ

Старение клетки — это комплекс внутриклеточных процессов, результатом которых является необратимая остановка клеточного роста. Давно описан феномен репликативного старения, которое индуцируется укорочением теломерной ДНК после каждого репликативного цикла [1]. Кроме того, клеточное старение могут индуцировать различные стимулирующие сигналы, включая активные формы кислорода, повреждение ДНК, недостаток факторов роста и др. [2, 3]. В настоящее время старение признано важнейшим механизмом, препятствующим онкогенной трансформации клеток, характерной особенностью которой является неограниченный клеточный рост, и условием развития опухоли, как правило, является нейтрализация этого механизма [4, 5]. Таким механизмом является так называемое онкоген-индуцированное старение (OIS — oncogene-induced senescence), которое развивается при онкогенном стрессе — экспрессии мутированных онкогенов [4, 5].

Согласно многочисленным данным старение клеток контролируется внутри- и внеклеточными сигналами, в числе которых существенная роль принадлежит сигналам, которые генерируются при адгезии клеток на внеклеточном матриксе и передаются в клетку при помощи трансмембранных рецепторов клеточной поверхности — интегринов [6, 7]. Интегрины вовлечены во все фундаментальные процессы жизнедеятельности организма [8, 9]. Хотя их участие в трансформации и прогрессии опухолей подтверждено

большим числом исследований [10, 11], сведений об их роли в механизмах старения относительно мало и они противоречивы. Есть данные, что супрессия ламинин-специфического интегрин $\alpha 6\beta 4$ тормозит развитие фенотипических признаков старения в эндотелиальных клетках, что свидетельствует о стимулировании старения этим рецептором [12]. Однако в клетках дыхательного эпителия блокирование $\alpha 6\beta 4$ усиливало фенотип старения [13].

Данные о критической роли интегрин $\alpha v\beta 3$ в противодействии старению клеток глиобластомы [14] не согласуются со стимулирующей старение функцией этого рецептора в клетках рака молочной железы [15].

Из интегриновых семейств менее всех охарактеризованы представители самого распространённого в животном мире семейства $\beta 1$. Практически отсутствуют работы, посвящённые роли в механизмах клеточного старения коллаген- и ламинин-специфических рецепторов — интегринов $\alpha 2\beta 1$ и $\alpha 3\beta 1$ соответственно. Одним из результатов наших исследований было обнаружение ранее не описанной (неканонической) функции протеинкиназы Akt (ключевого посредника во многих сигнальных каскадах) в проведении сигналов, инициируемых интегрин $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ и $\alpha 5\beta 1$ в высокоинвазивной линии SK-Mel-147 меланомы человека. [16-18]. Оказалось, что стимулирующее действие этих интегринов на инвазию меланомных клеток и противодействие их субстрат-зависимому апоптозу осуществляется через механизм, основанный на торможении активности одной из изоформ Akt

(Akt1 или Akt2), которые, таким образом, в данных клетках проявляют не свойственную этой протеинкиназе (неканоническую) функцию подавления инвазии и активации апоптоза. В недавних исследованиях нами было продемонстрировано, что механизм, с помощью которого коллаген-специфический интегрин $\alpha 2 \beta 1$ участвует в защите меланомных клеток от старения, лежит неканоническая функция изоформы Akt1 [19]. Задача настоящей работы состояла в определении роли других интегринов и изоферментов Akt в механизмах старения опухолевых клеток.

На клетках линии SK-Mel-147 меланомы человека было показано, что ламинин-специфический рецептор $\alpha 3 \beta 1$, как и $\alpha 2 \beta 1$, инициирует сигнальный механизм, противодействующий старению клеток меланомы, и в его реализации изоформа Akt1 также проявляет неканоническую активность. В то же время были обнаружены отличные от $\alpha 2 \beta 1$ особенности сигналинга $\alpha 3 \beta 1$, влияющие на фенотип старения.

МЕТОДИКА

Клетки и реагенты

Линия клеток SK-Mel-147 меланомы человека была получена в Мемориальном раковом центре "Sloan Kettering" (США). Клетки 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. За исключением специально оговоренных случаев в работе использовали также реагенты "Sigma" (США). Поликлональные антитела к $\alpha 3$ субъединице были получены от "Chemicon" (США). Поликлональные антитела к протеинкиназе Akt и её фосфорилированной форме (pAkt Ser473) и pErk Thr202/Tyr204, протеинкиназе mTOR (pmTOR Ser2448), белкам p53 и p21 получены от "Cell Signaling Tech" (США). Специфические ингибиторы Akt1 (XXIII), Akt2 (XII) и mTOR (рапамицин) получены от "Calbiochem" (США).

Старение клеток

Клетки пассировали в 12-луночных планшетах в течение 24 ч, промывали фосфатным буфером и проводили последующую обработку по протоколу и с реактивами фирмы "Bio Vision" (США). Клетки с признаками старения (содержащие окрашенные в зелёный цвет продукты реакции субстрата с β -галактозидазой) визуализировали под микроскопом и определяли их содержание (%) в общей популяции клеток [19].

Трансдукция клеток shRNA

Бактериальные глицириновые клоны, содержащие лентивирусный плазмидный вектор pLKO.1-puro с shRNA для $\alpha 3$ -интегриновой субъединицы или вектор с неспецифической shRNA (контроль), получены от "Sigma". Получение лентивирусных частиц и инфицирование клеток проводили, как описано ранее [20].

Пролиферация клеток

Пролиферацию клеток анализировали с помощью ММТ-теста: клетки (1×10^4 – 2×10^4) пассировали в 96-луночных планшетах в среде DMEM с сывороткой в течение различных временных интервалов, после чего добавляли 100 мкл ММТ (1 мг/мл в бессывороточной среде), инкубировали 3 ч и окрашенные кристаллы растворяли в 100 мкл ДМСО. Оптическую плотность растворов определяли при 570 нм в планшетном фотометре "Tecan Genios Plus" (Швейцария).

Электрофорез в полиакриламидном геле и иммуноблотинг

Клетки экстрагировали 50 mM Трис-HCl-буфером (pH 7,5), содержащим 1% Тритон X-100, 150 mM NaCl, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% додецилсульфат натрия (Ds-Na), а также смесь протеазных и фосфатазных ингибиторов ("Santa Cruz Biotech", США) из расчёта 1 мкл каждой смеси на 10^6 клеток, и центрифугировали 10 мин при 13000 g. Белки клеточного лизата (30 мкг) разделяли с помощью ПААГ-электрофореза и последующего электропереноса на мембрану PVDF [20]. После реакции со специфическими первичными антителами мембрану инкубировали с пероксидаза-конъюгированными иммуноглобулинами, проявляли с помощью реагентов ECL ("Amersham", Великобритания) и исследовали в системе визуализации ChemiDoc ("Bio-Rad", США; система входит в состав базового оборудования программы "Протеом человека" Института биомедицинской химии). Относительный количественный анализ белков иммуноблотов проводили с помощью программы Image Lab ("Bio-Rad").

Статистический анализ

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения роли исследуемого интегрин в механизмах старения исследовали влияние подавления его экспрессии на один из фенотипических признаков старения — активность β -галактозидазы (SA- β -Gal). Блокирование экспрессии $\alpha 3 \beta 1$ осуществляли путём трансдукции клеток плазмидным вектором, содержащим $\alpha 3$ -специфическую shRNA. Данные "вестерн-блот" анализа показали, что трансдукция клеток SK-Mel-147 $\alpha 3$ shRNA более чем в три раза снижает экспрессию $\alpha 3 \beta 1$ (рис. 1А). Как видно из рисунка 1В, супрессия $\alpha 3 \beta 1$ сопровождается двукратным увеличением содержания клеток с повышенной активностью SA- β -Gal, но, парадоксально, не приводит к изменению их пролиферативной активности (рис. 1Б), по крайней мере, в течение 48 ч роста в культуре. Это наблюдение не соответствует ранее полученным данным, что блокирование экспрессии интегрин $\alpha 2 \beta 1$

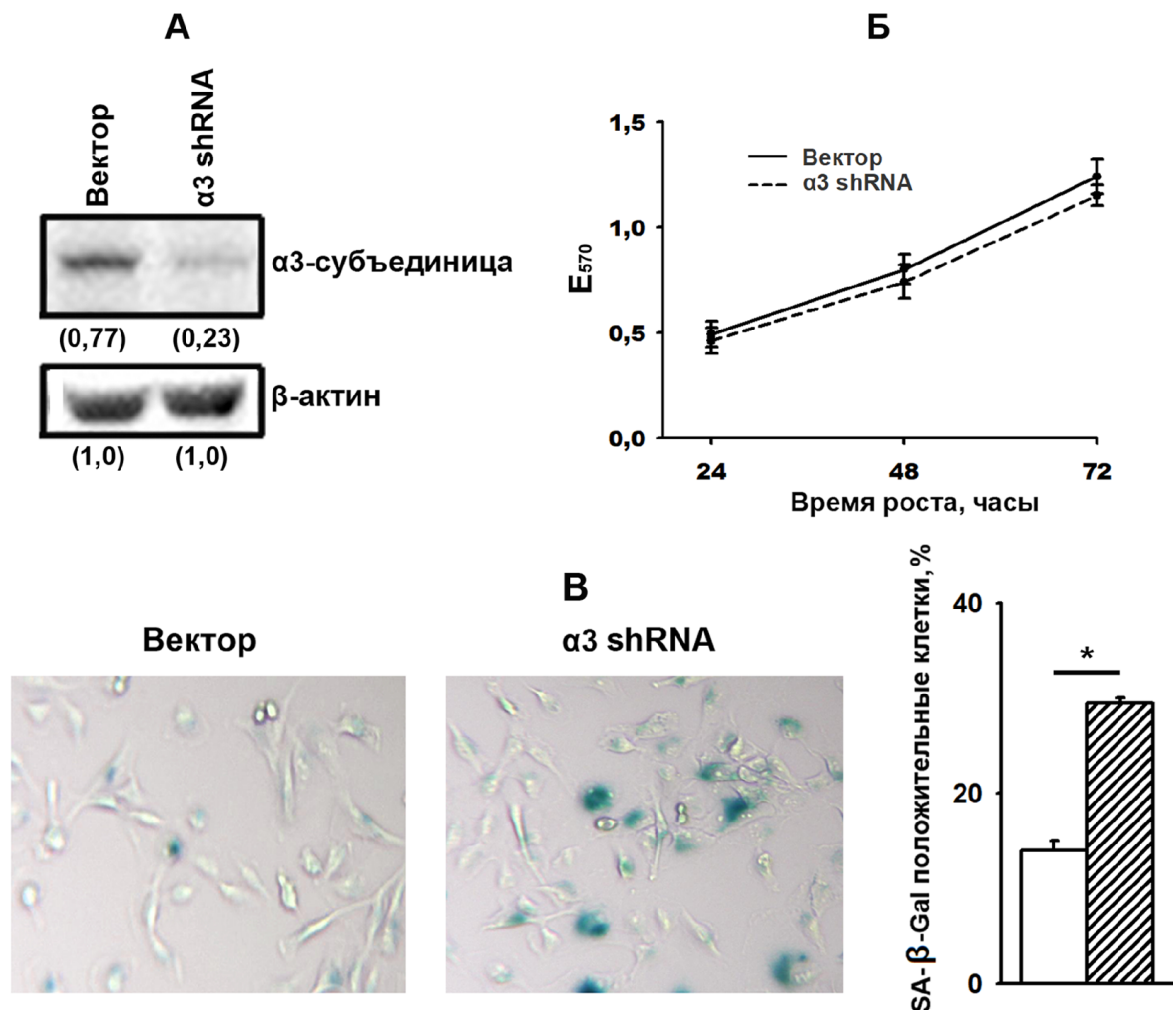


Рисунок 1. Блокирование экспрессии интегрина $\alpha 3 \beta 1$ усиливает старение клеток SK-Mel-147. **А** — иммуноблот-анализ эффективности супрессии интегрина $\alpha 3 \beta 1$. Клетки трансдуцировали вектором, содержащим неспецифическую (Вектор) или $\alpha 3$ -специфическую shRNA ($\alpha 3$ shRNA), как описано в разделе “Методика”. Белки клеточного лизата (30 мкг) разделяли электрофорезом в ПААГ с последующим электропереносом, обработкой антителами к соответствующим белкам (разведение 1:1000), окрашиванием и денситометрией, как описано в разделе “Методика”. Числа в скобках представляют данные денситометрии сигнальных белков, нормализованные относительно β -актина. Представлены данные типичного опыта. **Б** — влияние супрессии $\alpha 3 \beta 1$ на пролиферацию клеток SK-Mel-147. Клетки, трансдуцированные контрольным вектором или вектором, содержащим $\alpha 3$ shRNA, пассировали в 96-луночных планшетах в среде DMEM с сывороткой в течение указанного времени, и содержание клеток оценивали с помощью МТТ-теста. Представлены результаты трёх опытов ($M \pm SEM$). **В** — влияние супрессии $\alpha 3 \beta 1$ на старение клеток SK-Mel-147. Клетки, трансдуцированные соответствующим вектором, пассировали в 12-луночных планшетах в течение 24 ч, фиксировали и инкубировали в течение ночи при 37°C в растворе красителя, содержащем субстрат X-Gal (“BioVision”, США). Окрашенные клетки наблюдали в микроскопе (увеличение: $\times 200$) и подсчитывали количество клеток, содержащих синие-зелёные включения, — положительная реакция на β -галактозидазу (SA- β -Gal). Количество клеток, содержащих синие-зелёные включения, (%) SA- β -Gal-положительных клеток в общей популяции клеток. Представлены результаты трёх опытов ($M \pm SEM$; * — $p < 0,05$). Микроизображения фотографировали и обрабатывали с помощью редактора “Adobe Photoshop”.

существенно тормозит митотическую активность тех же клеток [19]. Это противоречие, вероятно, обусловлено тем, что супрессия $\alpha 3 \beta 1$ не влияла на активность протеинкиназы Erk в исследуемых клетках, в то время как блокирование $\alpha 2 \beta 1$ существенно снижало её активность [17, 19]. Важно отметить, что ингибирование Erk хотя и приводило к резкому торможению митотической активности SK-Mel-147, не влияло на активность SA- β -Gal в популяциях как интактных клеток, так и клеток с супрессированным $\alpha 2 \beta 1$ [19].

Таким образом, указанные рецепторы различаются по фенотипическим проявлениям старения как реакции на стресс, который индуцируется супрессией каждого из них. Известно, что феномен старения включает не только торможение и остановку роста, но также резкое усиление секреторного фенотипа клетки (SASP — senescence associated secretory phenotype) — избыточную секрецию множества метаболитов, в том числе лизосомальных ферментов, в частности, β -галактозидазы [4]. Сочетание этих фенотипических признаков зависит от силы

стрессового сигнала [2], и можно предполагать, что сигнал, вызванный недостатком $\alpha 2 \beta 1$, индуцирует стимуляцию SASP и торможение пролиферации, в то время как фенотипическим проявлением супрессии $\alpha 3 \beta 1$ является только усиление SASP.

Экспрессия сигнальных белков и роль Akt/mTOR сигналинга в $\alpha 3 \beta 1$ -контролируемом старении клеток SK-Mel-147

Известно, что в механизмах пролиферации, апоптоза и старения клеток критически важными являются 2 сигнальных пути: один из них опосредован онкосупрессором p53 и белком p21 (ингибитор 1 циклинзависимых киназ — CDK), а второй — белком p16 (ингибитор 2 CDK) и белками семейства ретинобластомы (Rb) [2]. Показано, что инициация старения осуществляется сигналами p53/p21, в то время как сигналинг p16/Rb обеспечивает продолжительность процесса. [2, 21]. Высокий уровень p53 и p21, характерный для начальной стадии старения, снижается на стадии активизации сигналинга p16/Rb [22]. Выбор между апоптозом и старением определяется также соотношением между p53 и p21; в основе стимулирующего эффекта p21 на старение лежит его способность ингибировать апоптоз, а высокая активность p53 ингибирует p21 [2].

p53/p21-зависимые клеточные реакции контролируются предшествующими (upstream) сигнальными посредниками, из которых ключевым является путь Ras/PI3K/Akt [23, 24]. Этот путь характерен для стрессовых вызовов, таких как повреждение ДНК, увеличение активных форм кислорода, радиационные повреждения и др. В нестрессовых условиях проявляется хорошо известная (каноническая) функция Akt-сигналинга, которая заключается в стимулировании пролиферации и выживании клеток, противодействии апоптозу, усилении опухолевой прогрессии и др. Она реализуется через активирование ряда факторов транскрипции, таких как NF- κ B, cMyc и др. [25]. Описаны защитные функции Akt против старения клеток, в частности, в поддержании целостности теломеров путём фосфорилирования hTERT и её транслокации из цитоплазмы в ядро [26, 27]. RASSF1-опосредованная активация p21 приводила к старению клеток аденокарциномы лёгкого через ингибирование Akt [28].

В наших исследованиях [19] была продемонстрирована роль сигнальной оси Akt/mTOR/p53/p21 в контроле старения клеток SK-Mel-147.

Было показано, что в клетках SK-Mel-147, лишённых $\alpha 2 \beta 1$, резко увеличена экспрессия апоптогенного белка p53 и регулируемого им белка p21 — ингибитора циклинзависимых киназ. Оказалось также, что супрессия этих белков полностью блокирует стимуляцию старения, обусловленную недостатком $\alpha 2 \beta 1$. Параллельно с усилением экспрессии p53/p21 в клетках со сниженной экспрессией $\alpha 2 \beta 1$ происходило значительное усиление экспрессии протеинкиназы Akt и её субстрата — протеинкиназы mTOR.

Для выяснения того, опосредуют ли эти сигнальные молекулы влияние интегрин $\alpha 3 \beta 1$ на старение, исследовали изменение их экспрессии в ответ на супрессию $\alpha 3 \beta 1$ в клетках SK-Mel-147. Данные, представленные на рисунке 2, показывают, что блокирование рецептора $\alpha 3 \beta 1$ увеличивает в 1,5-2,5 раза экспрессию белков p53 и p21 и активных (фосфорилированных) форм протеинкиназ Akt и mTOR. Повышенный уровень экспрессии p53 и p21 в клетках SK-Mel-147 с усиленным фенотипом старения соответствует известной их роли в механизмах старения. Эти результаты и наши ранее полученные данные [19] показывают также, что оба белка участвуют как в $\alpha 2 \beta 1$ - так и $\alpha 3 \beta 1$ -иницируемых путях, контролируемых клеточное старение.

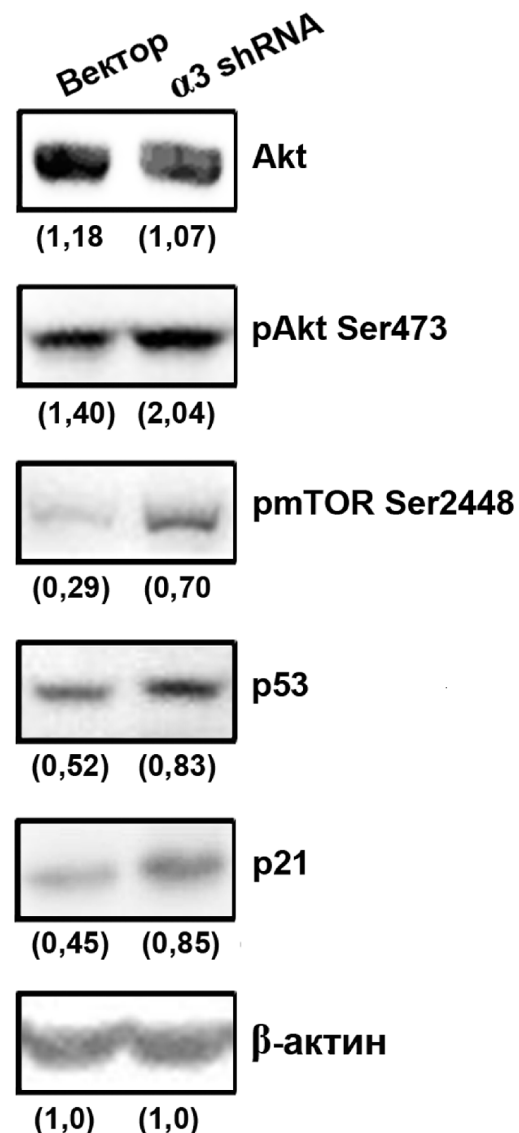


Рисунок 2. Влияние подавления экспрессии интегрин $\alpha 3 \beta 1$ на экспрессию сигнальных белков клеток SK-Mel-147. Белки лизата клеток, трансдуцированных соответствующим вектором, разделяли электрофорезом в ПААГ с последующим иммуноблотингом, как описано в разделе “Методика”. Числа в скобках представляют данные денситометрии сигнальных белков, нормализованные относительно β -актина. Представлены данные типичного опыта.

Активация Akt/mTOR в клетках меланомы в ответ на супрессию $\alpha 3\beta 1$ и усиление старения не соответствует описанным в цитированных работах функциям этих молекул, направленным на стимуляцию пролиферации, противодействию апоптозу и старению. Мы предположили, что эти киназы реализуют в клетках с супрессированным $\alpha 3\beta 1$ неканоническую активность, а именно стимулирование старения, подобно тому, что мы наблюдали в клетках SK-Mel-147 с блокированной экспрессией $\alpha 2\beta 1$ [19]. Для проверки этого предположения мы исследовали влияние ингибирования оси Akt/mTOR на старение клеток меланомы с супрессированным $\alpha 3\beta 1$. Для блокирования этого пути клетки обрабатывали рапамицином — специфическим ингибитором mTOR. Как видно из рисунка 3, подавление сигналинга PI3K/Akt/mTOR в значительной степени ослабляет старение, индуцированное супрессией $\alpha 2\beta 1$ в клетках SK-Mel-147. Эти результаты являются прямым доказательством того, что в клетках меланомы, лишённых $\alpha 3\beta 1$, Akt/mTOR сигналинг выполняет неканоническую функцию — стимулирование старения.

Роль изоформ Akt в $\alpha 3\beta 1$ -контролируемом механизме старения клеток SK-Mel-147

В ряде исследований нами и другими были выявлены существенные различия между изозимами протеинкиназы Akt во влиянии на различные фенотипические проявления роста и прогрессии опухолей [29-31]. Так, в клетках меланомы, дефицитных по интегрину $\alpha 3\beta 1$ и $\alpha 5\beta 1$,

изоформа Akt1, в отличие от Akt2, проявляла неканоническую активность в регулировании инвазивного фенотипа, в то время как в контролировании субстрат-зависимого апоптоза (аноикиса) в тех же клетках неканоническая активность была обнаружена у Akt2 [17]. Напротив, в клетках с супрессированным $\alpha 2\beta 1$ не была обнаружена неканоническая активность Akt2 в регулировании аноикиса и клеточного старения [16, 19].

Приведённые данные свидетельствуют, что вовлечение какого-либо из изоферментов Akt в сигналинг конкретного интегрина зависит от специфических свойств рецептора и от контролируемых им физиологических процессов в конкретной клеточной популяции. Исходя из этого, мы оценивали участие этих изоформ в $\alpha 3\beta 1$ -инициированном сигнальном пути, который контролирует старение клеток SK-Mel-147. Оценка основывалась на эффекте, оказываемом изозим-специфическими ингибиторами.

Как видно из рисунка 4А, блокирование изоформы Akt1 значительно тормозило экспрессию белков p53 и p21 в клетках, дефицитных по $\alpha 3\beta 1$, косвенно свидетельствуя о стимулирующем старение действии этой изоформы в данной клеточной популяции. Видно также, что ингибирование Akt2 не влияло существенно на экспрессию указанных белков в этой популяции. В связи с этим можно было предположить, что в исследуемых клетках дефицит интегрина $\alpha 3\beta 1$ стимулирует неканоническую активность Akt1. Прямым подтверждением этого предположения являются результаты, представленные

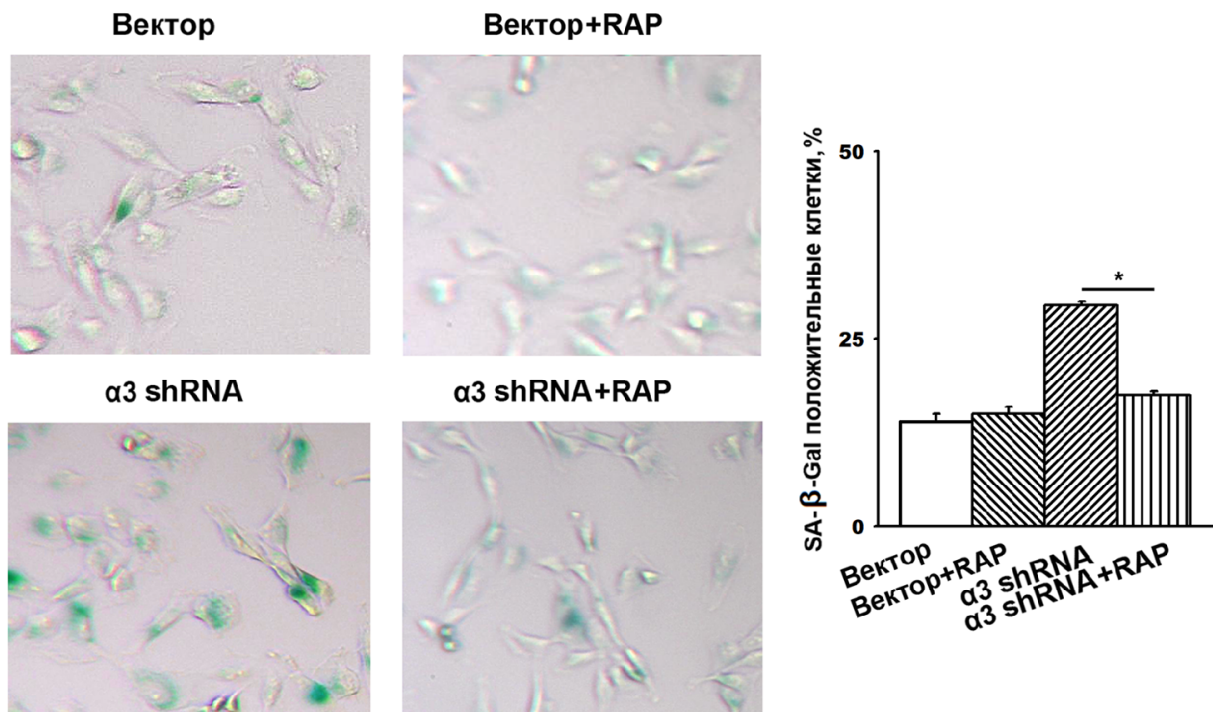


Рисунок 3. Ингибирование протеинкиназы mTOR препятствует старению, индуцированному супрессией $\alpha 3\beta 1$. Клетки, трансдуцированные соответствующим вектором, инкубировали в течение ночи в среде с пониженным содержанием сыворотки в присутствии 200 нМ рапамицина и окрашивали для выявления SA-β-Gal положительных клеток, как указано в подписи к рисунку 1. Представлены результаты трёх независимых опытов ($M \pm SEM$; * — $p < 0,05$). RAP — рапамицин.

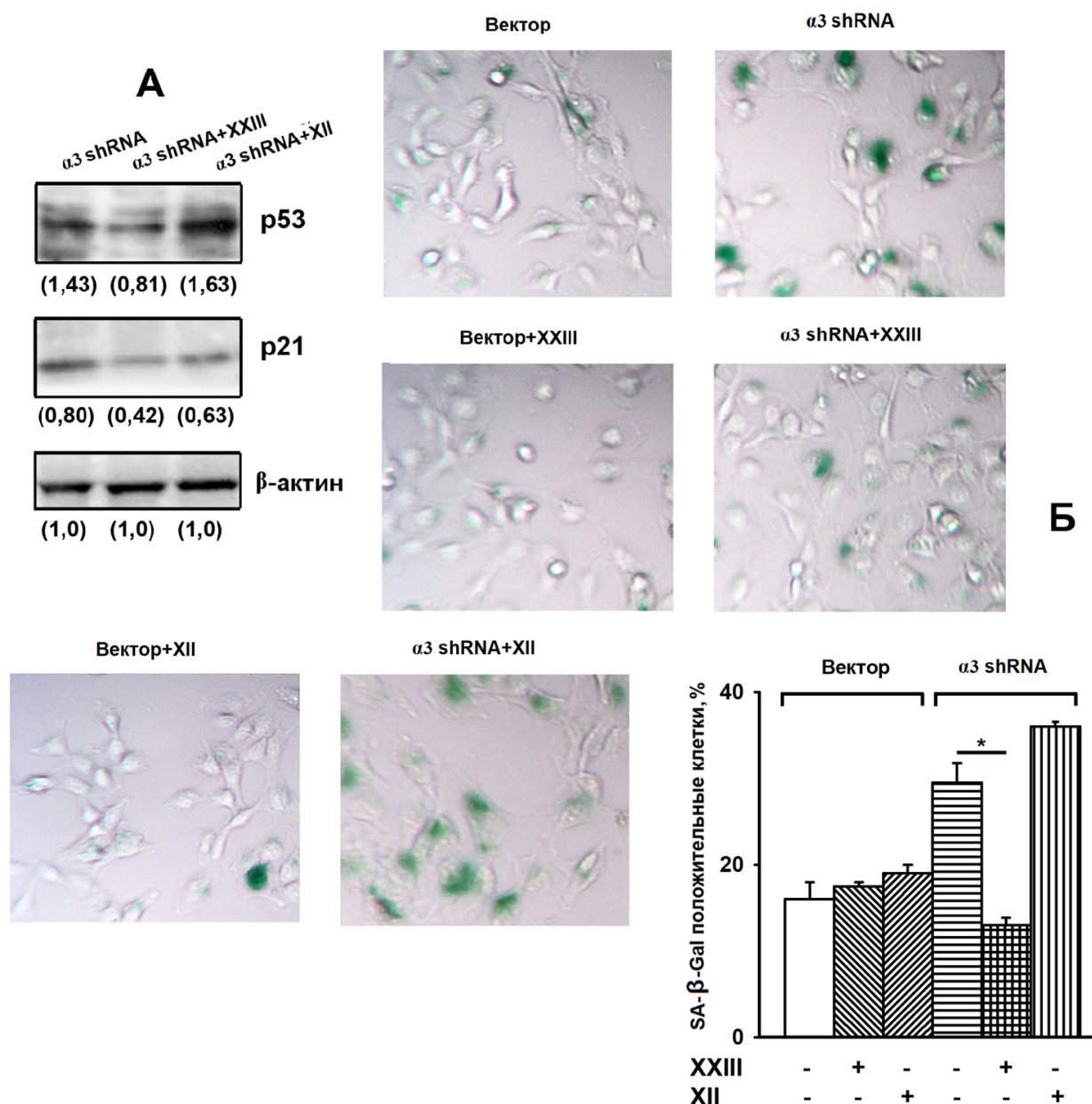


Рисунок 4. Неканонический эффект Akt1 на старение клеток SK-Mel-147. Клетки, трансдуцированные соответствующим вектором, обрабатывали Akt1-специфическим ингибитором XXIII (3 мкМ) или Akt2-специфическим ингибитором XXII (5 мкМ) в течение 24 ч при 37°C. **А** — иммуноблот-анализ влияния ингибиторов Akt-изозимов на экспрессию белков p53 и p21. Иммуноблотинг проводили, как описано в разделе “Методика” и подписях к рисункам 1 и 2. Представлены результаты типичного опыта. **Б** — влияние ингибиторов изозимов Akt на старение клеток SK-Mel-147. Клетки, трансдуцированные соответствующим вектором и обработанные ингибиторами Akt1 и Akt2, окрашивали для выявления SA-β-Gal положительных клеток, как описано в подписи к рисунку 1. Представлены результаты трёх независимых опытов ($M \pm SEM$; * — $p < 0,05$).

на рисунке 4Б, показавшие, что ингибирование Akt1 (но не Akt2) более чем в 2 раза снижало содержание клеток с фенотипом старения в популяции $\alpha 3 \beta 1$ -дефицитных клеток. Сопоставление этих результатов и ранее полученных данных [19] позволяет сделать вывод, что в сигнальных механизмах, инициируемых интегринными $\alpha 2 \beta 1$ и $\alpha 3 \beta 1$ в клетках меланомы, изозим Akt1 выполняет неканоническую функцию, направленную на стимулирование старения, и сигналы от обоих рецепторов проводятся по пути Akt1/p53/p21/mTOR.

Следует отметить, что в настоящее время протеинкиназы всё активнее используются в качестве мишеней при целевой терапии рака, и лечение основано, как правило, на подавлении активности этих ферментов, включая Akt [32, 33]. Однако то обстоятельство, что одни и те же протеинкиназы могут опосредовать сигнальные механизмы, активирующие разнонаправленные клеточные реакции в зависимости от типа клеток, рецептора, инициирующего сигнальный путь, и др., поднимает вопрос о риске этого подхода. Очевидно,

выбор тех или иных протеинкиназ в качестве мишени для клинического применения требует предварительного анализа свойств этих ферментов в конкретной популяции опухолевых клеток у конкретного пациента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На клетках линии SK-Mel-147 меланомы человека продемонстрирована позитивная роль интегрин $\alpha\beta 1$ в защите опухолевых клеток от старения. Исследование сигнальных путей, опосредующих участие указанного рецептора в механизмах старения, показало, что один из изоферментов протеинкиназы Akt — Akt1 выполняет неканоническую функцию, состоящую в проведении сигналов, усиливающих фенотип старения. Совместно с ранее опубликованными данными результаты настоящей работы свидетельствуют о специфических для отдельных интегринов сигнальных путях, контролирующих старение опухолевых клеток

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы) и поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, проект 20-015-00097.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Hayflick L. (1992) Aging, longevity, and immortality *in vitro*. *Exp Gerontol.*, **27**(4), 363-368. DOI: 10.1016/0531-5565(92)90066-9
- Mijit M., Caracciolo V., Melillo A., Amicarelli F., Giordano A. (2020) Role of p53 in the regulation of cellular senescence. *Biomolecules*, **10**(3), 420. DOI: 10.3390/biom.10030420
- van Deursen J.M. (2014) The role of senescent cells in ageing. *Nature*, **509**(7501), 439-446. DOI: 10.1038/nature.13193.
- Rodier F., Campisi J. (2011) Four faces of cellular senescence. *J. Cell. Biol.*, **192**(4), 547-556. DOI: 10.1083/jcb.201009094
- Hanahan D., Weinberg R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**(5), 646-674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Gutiérrez-Fernández A., Soria-Valles C., Osorio F.G., Gutiérrez-Abril J., Garabaya C., Aguirre A., Fueyo A., Fernández-García M.S., Puente X.S., López-Otín C. (2015) Loss of MT1-MMP causes cell senescence and nuclear defects which can be reversed by retinoic acid. *EMBO J.*, **34**(14), 1875-1888. DOI: 10.15252/embj.201490594
- Blokland K.E.C., Pouwels S.D., Schuliga M., Knight D.A., Burgess J.K. (2020) Regulation of cellular senescence by extracellular matrix during chronic fibrotic diseases. *Clin. Sci. (Lond.)*, **134**(20), 2681-2606. DOI: 10.1042/CS20190893
- Moreno-Layseca P., Icha J., Hamidi H., Ivaska J. (2019) Integrin trafficking in cells and tissues. *Nat. Cell. Biol.*, **21**(2), 122-132. DOI: 10.1038/s.41556-018-0223-z
- Desgrosellier J.S., Cheresh D.A. (2010) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer*, **10**(1), 9-22. DOI: 10.1038/nrc.2748.
- Hamidi H., Ivaska J. (2018) Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, **18**(9), 533-548. DOI: 10.1038/s41568-018-0038-z
- Cooper J., Giancotti F.G. (2019) Integrin signaling in cancer: mechanotransduction, stemness, epithelial plasticity, and therapeutic resistance. *Cancer Cell*, **35**(3), 347-367. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.01.007
- Liu X., Yin D., Zhang Y., Zhao J., Zhang S., Miao J. (2007) Vascular endothelial cell senescence mediated by integrin beta 4 *in vitro*. *FEBS Lett.*, **581**(28), 5337-5342. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.10.027
- Yuan L., Du X., Tang S., Wu S., Wang L., Xiang Y., Qu X., Liu H., Qin X., Liu C. (2019) ITGB4 deficiency induces senescence of airway epithelial cells through p53 activation. *FEBS J.*, **286**(6), 1191-1203. DOI: 10.1111/febs.14749
- Franovic A., Elliott K.C., Seguin L., Camargo M.F., Weis S.M., Cheresh D.A. (2015) Glioblastomas require integrin $\alpha\beta 3$ /PAK4 signaling to escape senescence. *Cancer Res.*, **75**(21), 4466-4473. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0988
- Rapisarda V., Borghesan M., Miguela V., Encheva V., Snijders A.P., Lujambio A., O'Loughlin A. (2017) Integrin beta 3 regulates cellular senescence by activating the TGF- β pathway. *Cell Rep.*, **18**(10), 2480-2493. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.02.012
- Kozlova N.I., Morozevich G.E., Ushakova N.A., Berman A.E. (2019) Implication of integrin $\alpha 2\beta 1$ in anoikis of SK-Mel-147 human melanoma cells: a non-canonical function of Akt protein kinase. *Oncotarget*, **10**(19), 1829-1839. DOI: 10.18632/oncotarget.26746
- Kozlova N.I., Morozevich G.E., Gevorkian N.M., Berman A.E. (2020) Implication of integrins $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ in invasion and anoikis of SK-Mel-147 human melanoma cells: non-canonical functions of protein kinase Akt. *Aging (Albany NY)*, **12**(23), 24345-24356. DOI: 10.18632/aging.202243
- Kozlova N.I., Morozevich G.E., Ushakova N.A., Berman A.E. (2018) Implication of integrin $\alpha 2\beta 1$ in proliferation and invasion of human breast carcinoma and melanoma cells: noncanonical function of Akt protein kinase. *Biochemistry (Moscow)*, **83**(6), 738-745. DOI: 10.1134/S0006297918060111
- Kozlova N.I., Morozevich G.E., Berman A.E. (2021) Implication of integrin $\alpha 2\beta 1$ in senescence of SK-Mel-147 human melanoma cells. *Aging (Albany NY)*, **13**(14), 18006-18017. DOI: 10.18632/aging.203309
- Morozevich G.E., Kozlova N.I., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E., Berman A.E. (2012) Integrin $\alpha 5\beta 1$ simultaneously controls EGFR-dependent proliferation and Akt-dependent pro-survival signaling in epidermoid carcinoma cells. *Aging (Albany NY)*, **4**(5), 368-374. DOI: 10.18632/aging.100457
- Rayess H., Wang M.B., Srivatsan E.S. (2012) Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int. J. Cancer*, **130**(8), 1715-1725. DOI: 10.1002/ijc.27316

22. Dolan D.W., Zupanec A., Nelson G., Hall P., Miwa S., Kirkwood T.B., Shanley D.P. (2015) Stochastic model of DNA damage repair by non-homologous end joining and p53/p21-mediated early senescence signalling. *PLoS Comput Biol.*, **11**(5), e1004246. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004246
23. Weichhart T. (2018) mTOR as regulator of lifespan, aging, and cellular senescence: a mini-review. *Gerontology*, **64**(2), 127-134. DOI: 10.1159/000484629
24. Xu Y., Li N., Xiang R., Sun P. (2014) Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence. *Trends Biochem. Sci.*, **39**(6), 268-276. DOI: 10.1016/j.tibs.2014.04.004
25. Revathidevi S., Munirajan A.K. (2019) Akt in cancer: mediator and more. *Semin. Cancer Biol.*, **59**, 80-91. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.06.002
26. Han X., Liu D., Zhang Y., Li Y., Lu W., Chen J., Songyang Z. (2013) *Aging Cell.*, **12**(6), 1091-1099. DOI: 10.1111/accel.12137
27. Chung J., Khadka P., Chung I.K. (2012) Nuclear import of hTERT requires a bipartite nuclear localization signal and Akt-mediated phosphorylation. *J. Cell Sci.*, **125**(Pt 11), 2684-2697. DOI: 10.1242/jcs.099267
28. Thaler S., Hähnel P.S., Schad A., Dammann R., Schuler M. (2009) RASSF1A mediates p21Cip1/Waf1-dependent cell cycle arrest and senescence through modulation of the Raf-MEK-ERK pathway and inhibition of Akt. *Cancer Res.*, **69**(5), 1748-1757. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1377
29. Jee H.J., Kim H.J., Kim A.J., Bae Y.S., Bae S.S., Yun J. (2009) UV light induces premature senescence in Akt1-null mouse embryonic fibroblasts by increasing intracellular levels of ROS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **383**(3), 358-362. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.04.017
30. Irie H.Y., Pearline R.V., Grueneberg D., Hsia M., Ravichandran P., Kothari N., Natesan S., Brugge J.S. (2005) Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.*, **171**(6), 1023-1034. DOI: 10.1083/jcb.200505087
31. Riggio M., Perrone M.C., Polo M.L., Rodriguez M.J., May M., Abba M., Lanari C., Novaro V. (2017) AKT1 and AKT2 isoforms play distinct roles during breast cancer progression through the regulation of specific downstream proteins. *Sci. Rep.*, **7**, 44244. DOI: 10.1038/srep44244
32. Yang J., Nie J., Ma X., Wei Y., Peng Y., Wei X. (2019) Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Mol. Cancer*, **18**(1), 26. DOI: 10.1186/s12943-019-0954-x
33. Asati V., Mahapatra D.K., Bharti S.K. (2016) PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: structural and pharmacological perspectives. *Eur. J. Med. Chem.*, **109**, 314-341. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.01.012.

Поступила в редакцию: 05. 01. 2022.
После доработки: 25. 01. 2022.
Принята к печати: 02. 02. 2022.

INTEGRIN $\alpha 3\beta 1$ SIGNALING IN REGULATION OF THE SK-Mel-147 MELANOMA CELL SENESCENCE

G.E. Morozevic, N.I. Kozlova, N.M. Gevorkian, A.E. Berman*

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail:1938berman@gmail.com

Using a model of the human SK-Mel-147 melanoma cell line, it was shown that blocking the expression of integrin $\alpha 3\beta 1$ by transduction of cells with $\alpha 3$ -specific shRNA did not affect their proliferation, but sharply increased the proportion of SA- β -Gal-positive cells, a phenotypic feature of cell senescence. These findings were accompanied by a significant increase in the activity of the Akt and mTOR protein kinases and the expression of p53 and p21 oncosuppressors. Pharmacological inhibition of mTORC1 reduced the number SA- β -Gal-positive cells in the SK-Mel-147 cell population depleted of $\alpha 3\beta 1$. Based on our recent data on a non-canonical function of Akt isomers in the regulation of SK-Mel-147 cell senescence caused by deficiency of $\alpha 2\beta 1$ receptor, we investigated the role of Akt isomers in senescence induced by the $\alpha 3\beta 1$ knockdown. It appeared that in the cell population with downregulated $\alpha 3\beta 1$, inhibition of Akt1 reduced the number SA- β -Gal positive cells to the level of control cell population, while inhibition of Akt2 had no visible effect. Our results demonstrate that the laminin-specific integrin $\alpha 3\beta 1$, like the collagen-specific receptor $\alpha 2\beta 1$, is involved in tumor cell protection from senescence, and senescence induced by $\alpha 3\beta 1$ depletion, like that caused by $\alpha 2\beta 1$ deficiency, is based on a signaling mechanism employing a non-canonical function of the Akt1 isoform.

Key words: tumor progression; cellular senescence; integrins; signaling; non-canonic function of Akt protein kinase

Funding. This investigation was carried out within the framework of the Program of Fundamental Scientific Research in the Russian Federation for a long-term period (2021-2030) and supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 20-015-00097.

Received: 05.01.2022, revised: 25.01.2022, accepted: 02.02.2022.