

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

### РОЛЬ ИНТЕГРИНА $\alpha 5\beta 1$ В МЕХАНИЗМАХ СТАРЕНИЯ КЛЕТОК SK-Mel-147 МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА

*Н.И. Козлова, Г.Е. Морозевич, Н.М. Геворкян, Л.К. Курбатов, А.Е. Берман\**

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

Подавление экспрессии интегрин  $\alpha 5\beta 1$  в культуральной модели линии SK-Mel-147 меланомы человека резко тормозит фенотипические проявления опухолевой прогрессии — пролиферацию и клональную активность клеток. Наблюдаемое при этом 2-3-кратное увеличение содержания SA- $\beta$ -Gal положительных клеток свидетельствовало об усилении фенотипа клеточного старения. Эти изменения сопровождались существенным ростом активности опухолевых супрессоров p53 и p21 и компонентов сигнального пути PI3K/Akt/mTOR/p70. Фармакологическое ингибирование mTORC1 снижало содержание SA- $\beta$ -Gal положительных клеток в популяции SK-Mel-147 клеток, дефицитных по  $\alpha 5\beta 1$ . Аналогичный эффект наблюдали при фармакологическом и генетическом ингибировании активности Akt1 — одного из трёх изоферментов протеинкиназы Akt; супрессия других изотипов Akt не влияла на старение меланомных клеток. Представленные в настоящей работе и ранее полученные результаты свидетельствуют, что  $\alpha 5\beta 1$  разделяет с другими интегринами  $\beta 1$ -семейства функцию защиты клеток от старения и, как и они, реализует эту функцию путём контролирования сигнального пути PI3K/Akt1/mTOR, в котором Akt1 проявляет неканоническую активность.

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

**DOI:** 10.18097/PBMC20236903156

## ВВЕДЕНИЕ

Настоящая работа является продолжением ранее проведённых исследований, направленных на выяснение роли интегринов — основных сигнальных посредников между внеклеточным матриксом и внутриклеточными процессами — в развитии и прогрессии опухолей. В культурах опухолевых клеток различных типов было показано, что интегрины семейств  $\beta 1$  и  $\beta 3$  опосредуют сигналы, стимулирующие опухолевую прогрессию, в частности, усиливают инвазивную активность, резистентность к субстрат-зависимому апоптозу (аноикису) и нейтрализуют механизмы клеточного старения — необратимой остановки роста клеток [1-7]. Эти данные согласуются с результатами многочисленных исследований о роли интегринов в онкогенезе [8]. Вместе с тем мы обнаружили, что в некоторых типах клеток данные рецепторы могут оказывать блокирующее действие на отдельные параметры прогрессии. В основе этого действия может быть специфическая для конкретного интегрин способность инициировать необычные (неканонические) сигнальные пути. Так, в модели клеточной линии MCF-7 аденокарциномы молочной железы человека стимулирование сигнальной активности  $\beta 1$  интегринов усиливало чувствительность клеток к аноикису [9]. Однако исследование линии SK-Mel-147 меланомы человека показало, что эти рецепторы повышают резистентность клеток к данному типу апоптоза [5, 6]. В этой же модели были обнаружены различия в опосредуемых интегрин  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$  и  $\alpha 5\beta 1$  сигнальных путях, вовлечённых в механизмы аноикиса и инвазивной активности опухолевых

клеток [5, 6, 10]. Оказалось, что в эти пути вовлечена протеинкиназа Akt, которая в обоих случаях выполняет неканоническую, несвойственную этому ключевому посреднику жизненных клеточных процессов функцию, направленную не на стимулирование, а на подавление фенотипических проявлений опухолевой прогрессии. Различие состояло в том, что в сигналинге, контролирующем инвазию, участвовал и проявлял неканоническую активность изотип Akt1, а в случае аноикиса — Akt2.

Обнаруженные различия между интегрин-зависимыми механизмами, контролирующими два фенотипических маркера злокачественной прогрессии, свидетельствовали о целесообразности исследования других характеристик опухолевого фенотипа, в частности механизмов, контролирующих клеточное старение. В недавних работах мы показали, что интегрины  $\alpha 2\beta 1$  и  $\alpha 3\beta 1$  участвуют в механизмах, которые защищают клетки меланомы от старения. Выяснилось, что в контролируемые обоими рецепторами пути вовлечён изотип Akt1, который выполняет неканоническую функцию [7, 11]. Однако существенное различие между указанными интегринами заключалось в том, что старение, индуцированное блокировкой экспрессии  $\alpha 2\beta 1$ , сопровождалось снижением клеточной пролиферации, чего не наблюдалось при стимулировании старения, вызванном супрессией рецептора  $\alpha 3\beta 1$ .

Данные литературы о роли интегринов в клеточном старении немногочисленны и неоднозначны, и характер действия этих рецепторов зависит от происхождения клеток. Так, активность рецептора  $\alpha \nu \beta 3$  и инициируемая им супрессия

белка p21 являются критическими для блокировки старения клеток глиобластомы. Но эту взаимосвязь не обнаружили при тестировании близкого по структуре и лигандным характеристикам интегрин  $\alpha v \beta 5$  и не наблюдали в линиях эпителиальных клеток [12]. Более того, в клетках кишечника и в культуре фибробластов была обнаружена чёткая корреляция между экспрессией  $\alpha v \beta 3$  и развитием фенотипа клеточного старения [13, 14]. Интегрины семейства  $\beta 1$  также различаются по эффектам, оказываемым на старение. Подавление экспрессии интегрин  $\alpha 5 \beta 1$  приводило к резкому усилению фенотипических признаков старения в культуре фибробластов, что свидетельствует о защитной от старения функции этого рецептора [15]. Однако в той же модели было продемонстрировано стимулирующее действие интегрин  $\alpha 6 \beta 1$  на фенотип старения [16, 17], а в культуре клеток остеосаркомы сигналы, стимулирующие этот фенотип, инициировались при общей активации рецепторов  $\beta 1$ -семейства [18].

Приведённые результаты наших и других работ подтверждают известную особенность интегринов, которая заключается в том, что не только представители одного или разных семейств, но один и тот же рецептор может инициировать разнонаправленные клеточные реакции в нормальных и опухолевых клетках. Для выяснения механизмов, лежащих в основе этого практически не исследованного феномена, важным представляется сравнительный анализ различных рецепторов и инициируемых ими сигнальных путей.

Целью настоящей работы было исследование участия интегрин  $\alpha 5 \beta 1$  в старении опухолевых клеток и характеристике сигнальных путей, опосредуемых этим рецептором. Для сопоставления с ранее полученными результатами анализа других  $\beta 1$ -рецепторов исследование было проведено на модели клеточной линии SK-Mel-147. В работе показано, что супрессия интегрин  $\alpha 5 \beta 1$  стимулирует развитие фенотипических признаков старения в клетках меланомы, и основой этого процесса является сигнальный механизм, в котором изофермент протеинкиназы Akt1 проявляет неканоническую активность.

## МЕТОДИКА

### *Клетки и реагенты*

Линия SK-Mel-147 меланомы человека была получена в Мемориальном раковом центре “Sloan Kettering” (США). Культивирование клеток проводили, как описано ранее [10]. В работе использовали реагенты “Sigma” (США), за исключением специально оговоренных случаев. Поликлональные антитела к  $\alpha 5$  субъединице получены от “Chemicon” (США). Поликлональные антитела к протеинкиназам и их фосфорилированным формам (Akt, pAkt Ser473, pErk Thr202/Tyr204, pmTOR Ser2448), белкам p53 и p21 получены от “Cell Signaling Tech” (США). Akt1-специфический ингибитор XXIII, Akt2-специфический ингибитор XII и mTOR ингибитор рапамицин получены от “Calbiochem” (США).

### *Старение клеток*

Клетки пассировали в 12-луночных планшетах в течение 24 ч, промывали фосфатным буфером. Последующую обработку проводили по протоколу и с реагентами фирмы “Bio Vision” (США). Клетки с признаками старения (содержащие окрашенные в зелёный цвет продукты реакции субстрата с  $\beta$ -галактозидазой) визуализировали под микроскопом и определяли их содержание (%) в общей популяции клеток [7].

### *Трансдукция клеток shRNA*

Бактериальные глицериновые клоны, содержащие лентивирусный плазмидный вектор pLKO.1-пуго с shRNA для  $\alpha 5$ -интегриновой субъединицы или “пустой вектор”, получены от компании “Sigma”. Лентивирусные клоны с векторами, содержащими shRNA, специфическими для изотипов протеинкиназы Akt (Akt1, Akt2 и Akt3), получены от “GeneCopoeia” (США). Получение лентивирусных частиц и инфицирование клеток проводили, как описано ранее [4].

*Пролиферацию клеток* анализировали по описанному методу [19]. Вкратце,  $(1-2) \times 10^4$  клеток пассировали в 96-луночных планшетах в среде DMEM с сывороткой в течение различных временных интервалов, после чего клетки окрашивали красителем кристалл виолет, экстрагировали метанолом и определяли оптическую плотность при 570 нм в планшетном фотометре “Tecan Genios Plus” (Швейцария).

### *Клональная активность (колониообразование)*

Клетки пассировали в 1% геле метилцеллюлозы в среде DMEM с сывороткой, как описано ранее [10]. Колонии окрашивали кристалл виолет. Чашки с колониями сканировали и подсчитывали количество колоний на изображении.

### *Электрофорез в полиакриламидном (ПААГ) геле и иммуноблотинг*

Получение клеточного лизата, электрофорез и электроперенос белков на мембрану PVDF проводили, как описано ранее [20]. После реакции со специфическими первичными антителами мембрану инкубировали с иммуноглобулинами, конъюгированными пероксидазой хрена, 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” НИИ биомедицинской химии). Относительный количественный анализ белков иммуноблотов проводили с помощью программы Image Lab (“Bio-Rad”).

### *Статистический анализ*

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

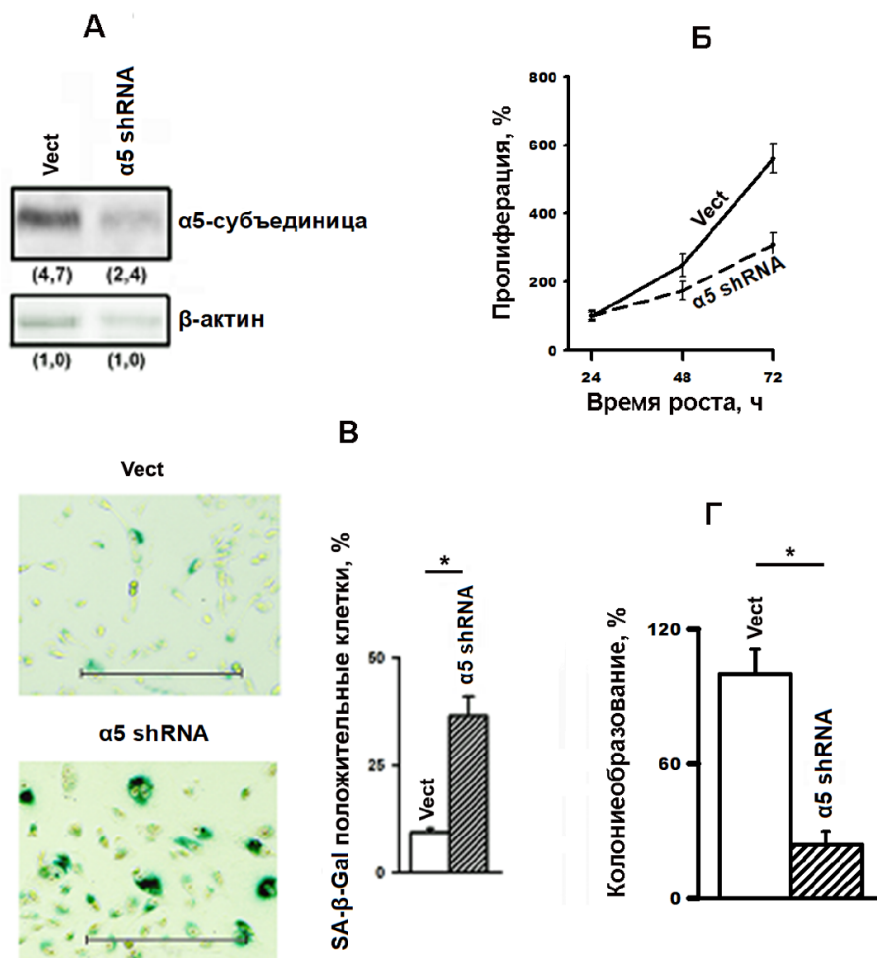
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Влияние супрессии  $\alpha 5 \beta 1$  на пролиферацию и старение клеток SK-Mel-147*

Характерным фенотипическим признаком клеточного старения является повышенная внутриклеточная секреция лизосомальных ферментов. Удобным для количественной оценки этого феномена ферментом является  $\beta$ -галактозидаза (SA- $\beta$ -Gal).

Роль  $\alpha 5 \beta 1$  в механизме старении оценивали по изменению активности SA- $\beta$ -Gal в популяции клеток с блокированной экспрессией интегрина. Супрессию  $\alpha 5 \beta 1$  осуществляли путём трансдукции клеток плазмидным вектором, несущим shRNA, специфическую для  $\alpha 5$  субъединицы.

Как видно из рисунка 1А, трансдукция клеток SK-Mel-147  $\alpha 5$ -специфической shRNA приводит к двукратному снижению экспрессии  $\alpha 5 \beta 1$



**Рисунок 1.** Супрессия интегрина  $\alpha 5 \beta 1$  стимулирует старение клеток SK-Mel-147. **А** – иммуноблот-анализ эффективности супрессии интегрина  $\alpha 5 \beta 1$ . Клетки трансдуцировали вектором, содержащим неспецифическую (Vect) или  $\alpha 5$ -специфическую shRNA ( $\alpha 5$  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  $\beta$ -актина. Представлены данные типичного опыта. **Б** – влияние супрессии  $\alpha 5 \beta 1$  на пролиферацию клеток SK-Mel-147. Клетки, трансдуцированные контрольным вектором или вектором, содержащим  $\alpha 5$  shRNA, пассировали в 96-луночных планшетах в среде DMEM с сывороткой в течение указанного времени, и содержание клеток оценивали по окраске кристалл виолет. Пролиферацию выражали в % от количества клеток через 24 ч роста в культуре. Представлены результаты трёх опытов ( $M \pm SEM$ ). **В** – влияние супрессии  $\alpha 5 \beta 1$  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, содержащего субстрат X-Gal. Визуализацию клеток проводили в микроскопе и подсчитывали количество клеток, содержащих сине-зелёные включения, – положительная реакция на  $\beta$ -галактозидазу (SA- $\beta$ -Gal); шкала 300 мкм. Количественной оценкой старения является содержание (%) SA- $\beta$ -Gal-положительных клеток в общей популяции клеток. Представлены результаты трёх опытов ( $M \pm SEM$ ). Здесь и далее звёздочкой указаны статистически значимые различия между сравниваемыми группами: \* –  $p < 0,02$ . **Г** – влияние супрессии  $\alpha 5 \beta 1$  на клональную активность клеток SK-Mel-147. 2000 клеток, трансдуцированных соответствующим вектором, пассировали в 1% полужидкой метилцеллюлозе в чашках Петри в течение 14 дней, как описано в разделе “Методика”. Колонии на чашках Петри окрашивали кристалл виолет, сканировали и считали количество колоний. Количество колоний, образованных клетками, трансдуцированными Vect, принято за 100%. Представлены результаты трёх опытов ( $M \pm SEM$ ).

и индуцирует 4-кратное увеличение содержания популяции клеток с повышенной активностью SA- $\beta$ -Gal (рис. 1Б). Эти изменения сопровождались резким торможением пролиферативной активности клеток меланомы (рис. 1Б) и их способности к формированию колоний (клональной активности) (рис. 1Г) — характерным свойством опухолевой прогрессии [21].

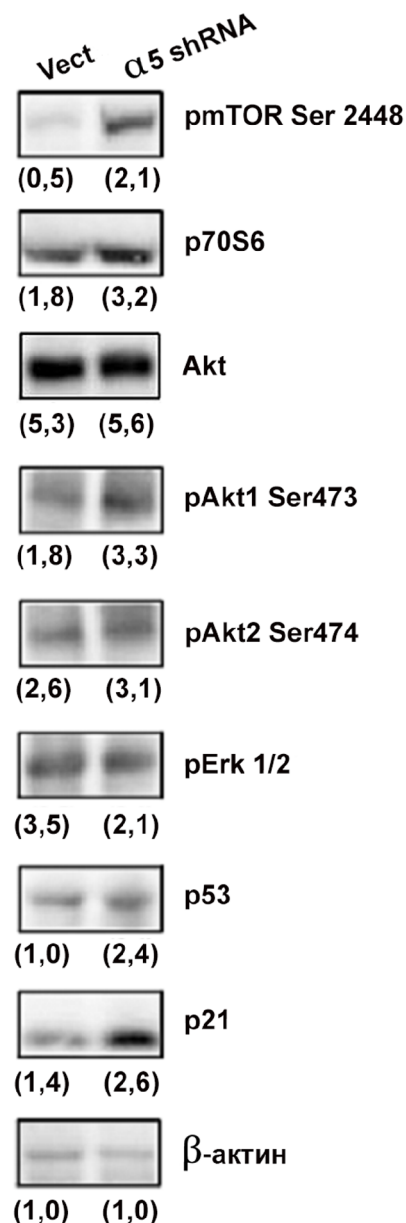
Важно отметить, что в отличие от  $\alpha 5\beta 1$ , усиление фенотипа старения в клетках SK-Mel-147 в ответ на супрессию рецептора  $\alpha 3\beta 1$  не влияло на их пролиферативную активность [11], в то время как стимулирование старения этих клеток, вызванное супрессией  $\alpha 2\beta 1$ , сопровождалось снижением митогенной активности клеток [7]. Эти различия между рецепторами одного семейства, вероятно, связаны с разным эффектом, который оказывает супрессия каждого из них на сигнальный путь Ras/Raf/MEK/Erk, контролирующей митогенную активность. В наших исследованиях блокирование экспрессии  $\alpha 2\beta 1$  и  $\alpha 5\beta 1$  приводило к снижению экспрессии активных форм Erk, в то время как супрессия  $\alpha 3\beta 1$  не влияла на активность этого фермента в клетках SK-Mel-147 [6, 7].

Усиление активности SA- $\beta$ -Gal является одним из проявлений связанного с феноменом старения секреторного фенотипа клетки (SASP-senescence associated secretory phenotype) — избыточной секреции различных метаболитов, в частности лизосомальных ферментов [22]. Развитие SASP, как и торможение и остановка роста, зависит от силы стрессового сигнала, которым является нарушение матрикс-клеточных связей, обусловленное супрессией интегринов [23]. Обнаруженные различия во влиянии  $\beta 1$  интегринов на фенотип старения клеток меланомы свидетельствуют о специфических для индивидуальных рецепторов сигнальных путях, контролирующих опухолевую прогрессию, и представляет интерес для целевой противоопухолевой терапии.

#### Роль p53/p21 и Akt/mTOR сигнальных путей в $\alpha 5\beta 1$ -контролируемом старении клеток SK-Mel-147

Старение клеток является альтернативным апоптозу завершением их жизни и оба процесса опосредованы сигнальным путём p53/p21 [24]. Выбор между этими альтернативами определяется балансом между апоптогенным белком p53 и его эффектором — ингибитором митотического цикла p21. Повышенный уровень p21 стимулирует старение, а высокая активность p53 снижает активность p21 [24].

В недавних исследованиях мы обнаружили, что усиление старения, вызванное недостатком  $\alpha 2\beta 1$  или  $\alpha 3\beta 1$ , приводит примерно к 2-кратному увеличению уровня фосфорилированных (активных) форм белков p21 и p53 в клетках SK-Mel-147, но не усиливает апоптоз последних [7, 11]. Из рисунка 2 видно, что супрессия  $\alpha 5\beta 1$  сопровождается таким же стимулирующим эффектом на активность p21 и p53 в меланомных клетках, и, как показал анализ митотического цикла, также не влияет на их апоптоз (данные не приведены).



**Рисунок 2.** Иммуно-блот анализ влияния блокировки  $\alpha 5\beta 1$  на экспрессию сигнальных белков в клетках SK-Mel-147. Белки лизата клеток, трансдуцированных Vect или  $\alpha 5$  shRNA, разделяли электрофорезом в ПААГ с последующим иммуноблотингом, как описано в разделе “Методика”. Числа в скобках представляют данные денситометрии сигнальных белков, нормализованные относительно  $\beta$ -актина. Представлены данные типичного опыта.

Данные иммуноблот-анализа (рис. 2) показывают, что в клетках SK-Mel-147, обеднённых по  $\alpha 5\beta 1$ , существенно увеличено содержание активных форм протеинкиназы Akt и её нижележащих (“downstream”) сигнальных посредников — протеинкиназ mTOR и p70S6. Известно, что сигнальная ось PI3K/Akt/mTOR играет ключевую роль в разнообразных реакциях клеток и, в частности, контролирует активность p53/p21 — эффекторов клеточного старения [25, 26]. Фундаментальная (каноническая) функция Akt-опосредуемого

сигналинга заключается в участии в процессах, направленных на выживание клеток: стимуляцию пролиферации и роста, блокировку механизмов гибели клеток и их старения. Эта функция реализуется Akt-опосредуемыми сигнальными цепями, блокирующими p53 и апоптогенные белки семейства Bcl-2 [27].

Однако при некоторых стрессовых ситуациях Akt проявляет “обращённую” (неканоническую) активность и опосредует пути, которые активируют p53/p21 и стимулируют развитие клеточного старения [25, 26, 28]. В нормальных клетках стрессовыми сигналами, инициирующими старение, являются эрозия теломеров, снижение активности теломеразы, повреждение ДНК и др., которые приводят к так называемому репликативному старению. Для опухолевых клеток наиболее характерно старение, индуцированное гиперактивностью онкогенов — OIS (oncogene-induced senescence) [25, 26]. В обоих типах клеток механизм старения основан на опосредованном Akt активировании p53 и p21 [25, 28]

Согласно нашим результатам, старение клеток меланомы как реакция на стресс, вызванный подавлением экспрессии рецепторов  $\alpha 2 \beta 1$  и  $\alpha 3 \beta 1$ , также реализуется через неканоническую активность Akt — активацию указанных онкосупрессоров [7, 11].

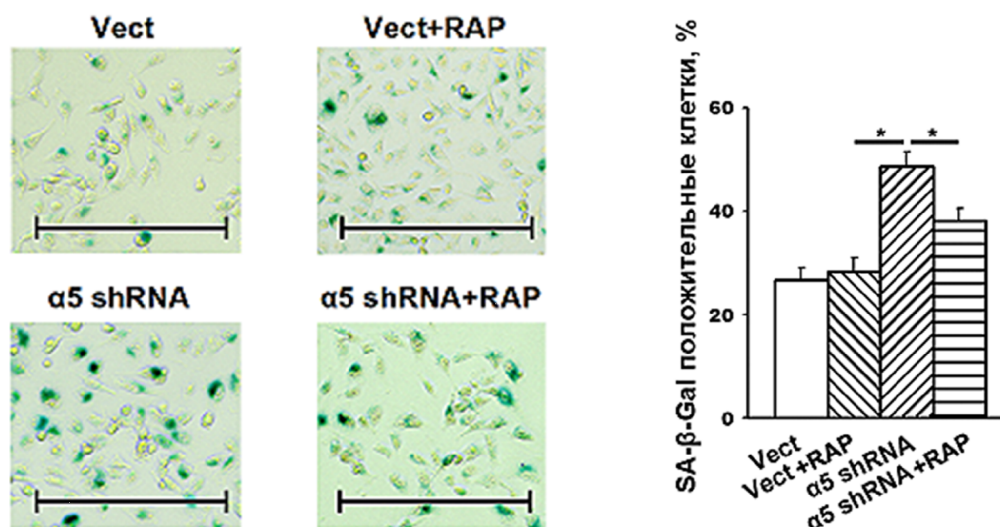
Обнаруженная в настоящей работе активация Akt/mTOR в клетках SK-Mel-147 со сниженной экспрессией  $\alpha 5 \beta 1$  и усиленным фенотипом старения позволяет предположить, что и этот рецептор опосредует механизм, основанный на неканонической функции указанных протеинкиназ.

Для проверки этого предположения определяли влияние ингибиторов протеинкиназ на старение исследуемых клеток. Из рисунка 3 видно, что обработка рапамицином — специфическим

ингибитором протеинкиназы mTOR — в значительной степени блокирует старение клеток SK-Mel-147, индуцированное недостатком  $\alpha 5 \beta 1$ .

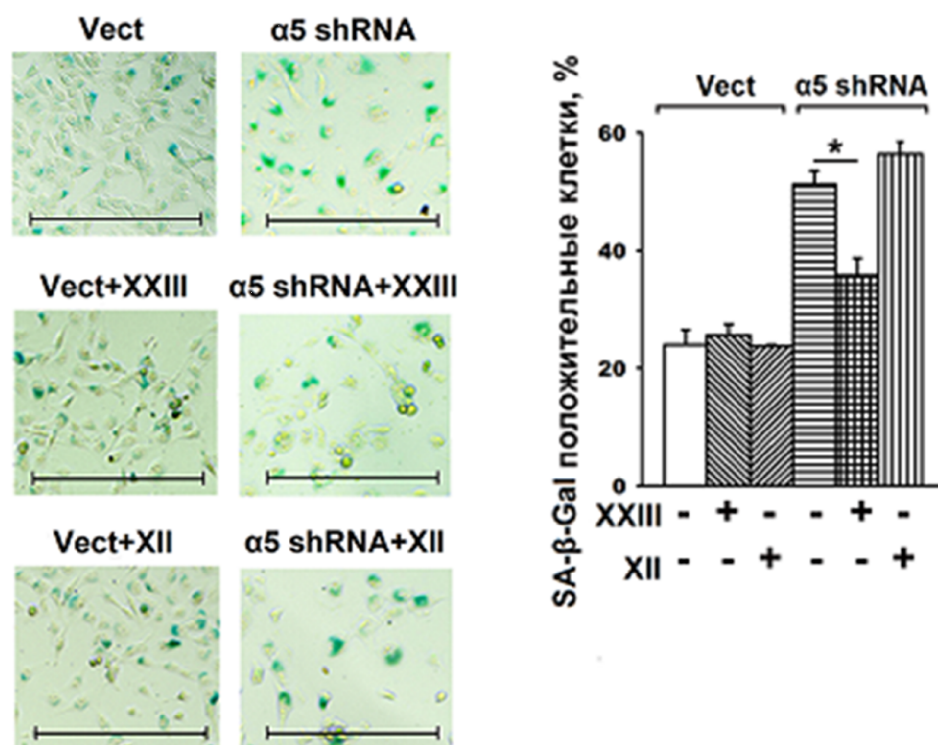
Эти данные являются прямым доказательством неканонической функции Akt/mTOR сигналинга в  $\alpha 5 \beta 1$ -зависимом механизме старения клеток меланомы. Они согласуются с ранее полученными результатами о подобной роли этого сигнального пути не только в старении, но и в других проявлениях опухолевой прогрессии, которые реализуются с участием  $\beta 1$ -интегринов [5-7, 10, 11]. Важной особенностью Akt-сигналинга в клетках меланомы, обнаруженной в этих работах, является то, что разные изоферменты Akt (из трёх идентифицированных) могут проявлять неканоническую активность в зависимости от интегрин, опосредующего передачу сигнала, и, по-видимому, от контролируемого им параметра опухолевой прогрессии. Так, в сигнальных путях, которые опосредуют влияние рецепторов  $\alpha 3 \beta 1$  и  $\alpha 5 \beta 1$  на инвазивный фенотип клеток меланомы, неканонические свойства проявлял изозим Akt1, в то время как в механизмах, контролирующих субстрат-зависимый апоптоз с участием этих рецепторов, “обращённые” свойства демонстрировал изозим Akt2 [6]. С другой стороны, в сигналинге, который опосредует влияние интегрин  $\alpha 2 \beta 1$  на апоптоз, неканоническая активность была обнаружена у Akt1 [5].

В настоящей работе косвенным свидетельством неканонической функции изоформ Akt в стимулировании старения клеток SK-Mel-147, вызванного дефицитом  $\alpha 5 \beta 1$ , является повышенный уровень активной (фосфорилированной) формы Akt1 и, в значительно меньшей степени, Akt2 (рис. 2). Для получения прямого доказательства того, что блокирование  $\alpha 5 \beta 1$  стимулирует неканоническую активность этих изоформ, исследовали влияние изозим-специфических ингибиторов на старение исследуемых клеток. Из рисунка 4 видно,



**Рисунок 3.** Действие ингибитора протеинкиназы mTOR на старение клеток SK-Mel-147 со сниженной экспрессией  $\alpha 5 \beta 1$ . Клетки, трансдуцированные Vect или  $\alpha 5$  shRNA, 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 ( $M \pm SEM$ ); масштаб 300 мкм. RAP — рапамицин.





**Рисунок 4.** Эффект фармакологического ингибирования изоформ Akt на старение клеток SK-Mel-147. Клетки, трансдуцированные Vect или  $\alpha 5$  shRNA, обрабатывали Akt1-специфическим ингибитором XXIII (3 мкМ) или Akt2-специфическим ингибитором XXII (5 мкМ) в течение 24 ч при 37°C, окрашивали для выявления SA-β-Gal положительных клеток, как описано в подписи к рисунку 1. Представлены результаты трёх независимых опытов ( $M \pm SEM$ ); масштаб 300 мкм.

что фармакологическое ингибирование изоформы Akt1 на 30% снижало содержание клеток с фенотипом старения в общей популяции  $\alpha 5\beta 1$ -дефицитных клеток, но не влияло на фенотип интактных клеток (с высоким уровнем экспрессии  $\alpha 5\beta 1$ ). Видно также, что блокада Akt2 не влияла на старение клеток вне зависимости от уровня экспрессии этого рецептора.

Поскольку ингибиторы близких по субстратной специфичности протеинкиназ могут при определённых концентрациях оказывать перекрестный эффект, исследовали влияние генетического ингибирования изоформ Akt на старение SK-Mel-147 клеток. С этой целью в клетках, обеднённых по  $\alpha 5\beta 1$ , блокировали экспрессию изоформ путём трансфекции изозим-специфических shRNA. Данные иммуно-блот анализа (рис. 5А) продемонстрировали практически полную блокировку экспрессии каждого из изоферментов Akt в клетках, трансдуцированных соответствующей shRNA, и высокую специфичность эффекта — отсутствие перекрёстной блокировки при трансдукции каждой из них.

Как видно из рисунка 5Б, генетическое подавление активности изоформ Akt оказывало на старение интактных и  $\alpha 5\beta 1$ -обеднённых клеток такой же эффект, который наблюдали при фармакологическом ингибировании: блокировка Akt1 препятствует усилению старения клеток SK-Mel-147, связанного с дефицитом этого рецептора. Супрессия других изоформ не влияла на старение указанных клеточных популяций.

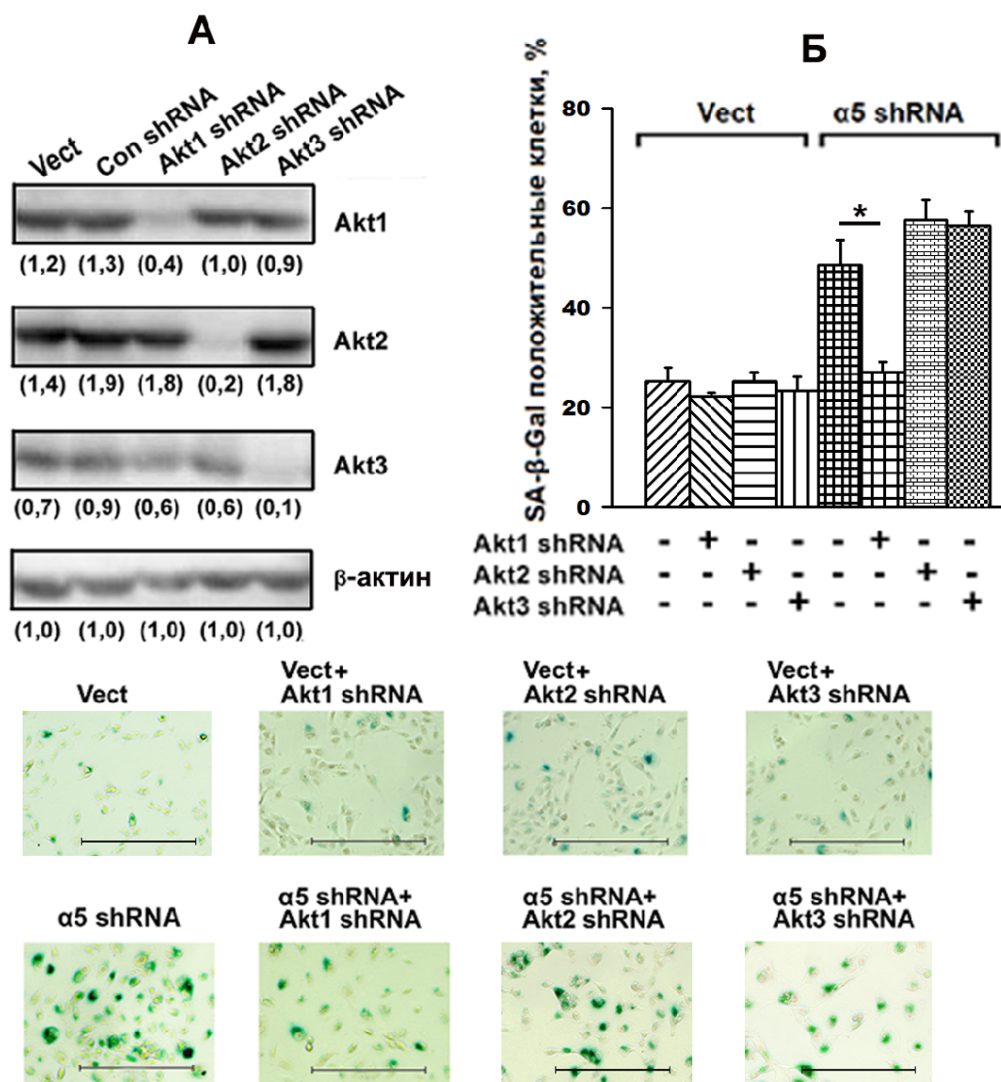
Таким образом, интегрин  $\alpha 5\beta 1$  разделяет с другими рецепторами  $\beta 1$ -семейства функцию защиты клеток меланомы от клеточного старения и, как и они, реализует эту функцию путём контроля сигнального пути PI3K/Akt1/mTOR, в котором Akt1 проявляет неканоническую активность. Сходство интегринов  $\beta 1$ -семейства по сигнальному пути, контролирующему опухолевую прогрессию, позволяет рассматривать блокировку общей для этих рецепторов  $\beta 1$ -субъединицы в качестве потенциального подхода в противоопухолевой терапии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В модели растущих в культуре клеток меланомы человека установлена позитивная роль интегрин  $\alpha 5\beta 1$  в механизме защиты опухолевых клеток от старения и продемонстрирована неканоническая функция протеинкиназы Akt1 в опосредуемых  $\alpha 5\beta 1$  и другими рецепторами  $\beta 1$ -семейства сигнальных путях, участвующих в указанном механизме. Результаты настоящей работы и ранее полученные данные представляют интерес в аспекте целевой противоопухолевой терапии.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы) (№ 122022800499-5).



**Рисунок 5.** Эффект генетического ингибирования изотимов Akt на старение клеток SK-Mel-147. **А** – иммуноблот-анализ эффективности трансдукции клеток Akt изотим-специфическими shRNA. Клетки, трансдуцированные Vect, трансдуцировали векторами, содержащими Akt1-, Akt2- или Akt3-специфические shRNA, как описано в инструкции фирмы GeneCorpora. Электрофорез в ПААГ и последующую обработку проводили, как описано в разделе “Методика” и в подписи к рисунку 1. **Б** – влияние супрессии изотимов Akt на старение клеток SK-Mel-147. Клетки, трансдуцированные Vect или α5 shRNA, трансдуцировали изотим-специфическими shRNA с последующей идентификацией SA-β-Gal положительных клеток, как описано в подписи к рисунку 1. Представлены результаты трёх независимых опытов ( $M \pm SEM$ ); масштаб 300 мкм.

## 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

1. Kozlova N.I., Morozovich G.E., Shtil A.A., Berman A.E. (2004) Multidrug-resistant tumor cells with decreased malignancy: A role for integrin  $\alpha \beta 3$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **316**, 1173-1177. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.03.004
2. Морозевич Г.Е., Козлова Н.И., Чеглаков И.Б., Ушакова Н.А., Преображенская М.Е., Берман А.Е. (2008) Участие интегрин  $\alpha 5 \beta 1$  в инвазивной активности клеток лекарственно-устойчивой линии MCF-7/ADR карциномы молочной железы: роль коллагеназы ММП-2. *Биохимия*, **73**(7), 981-988. [Morozovich G.E., Kozlova N.I., Cheglakov I.B., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E., Berman A.E. (2008) Implication of  $\alpha 5 \beta 1$  integrin in invasion of drug-resistant MCF-7/ADR breast carcinoma cells: A role for MMP-2 collagenase. *Biochemistry (Moscow)*, **73**(7), 791-796.] DOI: 10.1134/s0006297908070079
3. Morozovich G., Kozlova N., Cheglakov I., Ushakova N., Berman A. (2009) Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  controls invasion of human breast carcinoma cells by direct and indirect modulation of MMP-2 collagenase activity. *Cell Cycle*, **15**, 2219-2225. DOI: 10.4161/cc.8.14.8980

4. *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**, 368-374. DOI: 10.18632/aging.100457
5. *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**, 1829-1839. DOI: 10.18632/oncotarget.26746
6. *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**, 24345-24356. DOI: 10.18632/aging.202243
7. *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**, 18006-18017. DOI: 10.18632/aging.203309
8. *Valdembri D., Serini G.* (2021) The roles of integrins in cancer. *Faculty Reviews*, **10**, 45. DOI: 10.12703/r/10-45
9. *Морозевич Г.Е., Козлова Н.И., Преображенская М.Е., Ушакова Н.А., Ельцов И.А., Штиль А.А., Берман А.Е.* (2006) Роль интегринов семейства  $\beta 1$  в субстратзависимом апоптозе клеток карциномы молочной железы, различающихся по множественной лекарственной устойчивости. *Биохимия*, **71**(5), 607-614. [*Morozevich G.E., Kozlova N.I., Preobrazhenskaya M.E., Ushakova N.A., Elitsov I.A., Shitil A.A., Berman A.E.* (2006) The role of  $\beta 1$  integrin subfamily in anchorage-dependent apoptosis of breast carcinoma cells differing in multidrug resistance. *Biochemistry* (Moscow), **71**(5), 489-495.] DOI: 10.1134/S000629790605004x
10. *Козлова Н.И., Морозевич Г.Е., Ушакова Н.А., Берман А.Е.* (2018) Участие интегрина  $\alpha 2 \beta 1$  в механизмах пролиферации и инвазии клеток рака молочной железы и меланомы человека: неканоническая функция протеинкиназы Akt. *Биохимия*, **83**(6), 939-948. [*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
11. *Морозевич Г.Е., Козлова Н.И., Геворкян Н.М., Берман А.Е.* (2022) Сигналинг интегрина  $\alpha 3 \beta 1$  в регулировании старения клеток SK-Mel-147 меланомы человека. *Биомедицинская химия*, **68**(1), 39-46. [*Morozevich G.E., Kozlova N.I., Gevorkian N.M., Berman A.E.* (2022) Integrin  $\alpha 3 \beta 1$  signaling in regulation of the SK-Mel-147 melanoma cell senescence. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **68**(1), 39-46.] DOI: 10.18097/PBMC20226801039
12. *Franovic A., Elliott K.C., Seguin L., Camargo M.F., Weis S.M., Cheresch D.A.* (2015) Glioblastomas require integrin  $\alpha v \beta 3$ /PAK4 signaling to escape senescence. *Cancer Res.*, **75**, 466-473. DOI: 10.1158/0008-5472
13. *Tun X., Wang E.J., Gao Z., Lundberg K., Xu R., Hu D.* (2023) Integrin  $\beta 3$ -mediated cell senescence associates with gut inflammation and intestinal degeneration in models of Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**(6), 5697. DOI: 10.3390/ijms24065697
14. *Rapisarda V., Borghesan M., Miguela V., Encheva V., Snijders A.P., Lujambio A., O'Loughlen A.* (2017) Integrin  $\beta 3$  regulates cellular senescence by activating the TGF- $\beta$  pathway. *Cell Rep.*, **18**, 2480-2493. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.02.012
15. *Mancini M., Saintigny G., Mahé C., Annicchiarico-Petruzzelli M., Melino G., Candi E.* (2012) MicroRNA-152 and -181a participate in human dermal fibroblasts senescence acting on cell adhesion and remodeling of the extra-cellular matrix. *Aging* (Albany NY), **4**, 843-853. DOI: 10.18632/aging.100508
16. *Lau L.F.* (2011) CCN1/CYR61: The very model of a modern matricellular protein. *Cell Mol. Life Sci.*, **68**, 149-163. DOI: 10.1007/s00018-011-0778-3
17. *Jun J.I., Lau L.F.* (2010) The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nature Cell Biology*, **12**, 676-685. DOI: 10.1038/ncb2070
18. *Nakagawa K., Nagano T., Katasho R., Iwasaki T., Kamada S.* (2022) Integrin  $\beta 1$  transduces the signal for LY6D-induced macropinocytosis and mediates senescence-inducing stress-evoked vacuole formation via FAK. *FEBS Lett.*, **596**, 2768-2780. DOI: 10.1002/1873-3468.14477
19. *Feoktistova M., Geserick P., Leverkus M.* (2016) Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb. Protoc.*, **4**, pdb.prot087379. DOI: 10.1101/pdb.prot087379
20. *Морозевич Г.Е., Козлова Н.И., Сусова О.Ю., Каралкин П.А., Берман А.Е.* (2015) Участие интегрина  $\alpha 2 \beta 1$  в механизме аноикиса клеток MCF-7 карциномы молочной железы человека. *Биохимия*, **80**, 123-131. [*Morozevich G.E., Kozlova N.I., Susova O.Yu., Karalkin P.A., Berman A.E.* (2015) Implication of  $\alpha 2 \beta 1$  integrin in anoikis of MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochemistry* (Moscow), **80**, 97-103.] DOI: 10.1134/S0006297915010113
21. *Welte Y., Adjaye J., Lehrach H.R., Regenbrecht C.R.* (2010) Cancer stem cells in solid tumors: Elusive or illusive? *Cell Commun. Signal.*, **8**, 6. DOI: 10.1186/1478-811X-8-6
22. *Rodier F., Campisi J.* (2011) Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.*, **192**, 547-556. DOI: 10.1083/jcb.201009094
23. *Deschênes-Simard X., Kottakis F., Meloche S., Ferbeyre G.* (2014) ERKs in cancer: Friends or foes? *Cancer Res.*, **74**, 412-419. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2381
24. *Mijit M., Caracciolo V., Melillo A., Amicarelli F., Giordano A.* (2020) Role of p53 in the regulation of cellular senescence. *Biomolecules*, **10**, 420. DOI: 10.3390/biom10030420
25. *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**, 268-276. DOI: 10.1016/j.tibs.2014.04.004
26. *Weichhart T.* (2018) mTOR as regulator of lifespan, aging, and cellular senescence: A mini-review. *Gerontology*, **64**, 127-134. DOI: 10.1159/000484629
27. *Manning B.D., Cantley L.C.* (2007) AKT/PKB signaling: Navigating downstream. *Cell*, **129**, 1261-1274. DOI: 10.1016/j.cell.2007.06.009
28. *Miyauchi H., Minamino T., Tateno K., Kunieda T., Toko H., Komuro I.* (2004) Akt negatively regulates the *in vitro* lifespan of human endothelial cells via a p53/p21-dependent pathway. *EMBO J.*, **23**, 212-220. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600045

Поступила в редакцию: 15. 05. 2023.  
После доработки: 30. 05. 2023.  
Принята к печати: 01. 06. 2023.



IMPLICATION OF INTEGRIN  $\alpha 5\beta 1$  IN SENESENCE OF SK-Mel-147 HUMAN MELANOMA CELLS

*N.I. Kozlova, G.E. Morozovich, N.M. Gevorkian, L.K. Kurbatov, A.E. Berman\**

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

Downregulation of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in the SK-Mel-147 human melanoma culture model sharply inhibits the phenotypic manifestations of tumor progression: cell proliferation and clonal activity. This was accompanied by a 2-3-fold increase in the content of SA- $\beta$ -Gal positive cells thus indicating an increase in the cellular senescence phenotype. These changes were accompanied by a significant increase in the activity of p53 and p21 tumor suppressors and components of the PI3K/Akt/mTOR/p70 signaling pathway. Pharmacological inhibition of mTORC1 reduced the content of SA- $\beta$ -Gal positive cells in the population of  $\alpha 5\beta 1$ -deficient SK-Mel-147 cells. A similar effect was observed with pharmacological and genetic inhibition of the activity of Akt1, one of the three Akt protein kinase isoenzymes; suppression of other Akt isozymes did not affect melanoma cell senescence. The results presented in this work and previously obtained indicate that  $\alpha 5\beta 1$  shares with other integrins of the  $\beta 1$  family the function of cell protection from senescence. This function is realized via regulation of the PI3K/Akt1/mTOR signaling pathway, in which Akt1 exhibits a non-canonical activity.

*The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.*

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

**Funding.** The work was carried out within the framework of the Long-Term Program of Fundamental Scientific Research in the Russian Federation (2021–2030) (No. 122022800499-5).

Received: 15.05.2023; revised: 30.05.2023; accepted: 01.06.2023.