

УДК 577.2+577.29+57.021

## Цитотоксическое действие 5-фторурацила на клетки колоректального рака HT29 модулируется ламинином 521

© 2019 М. П. РАЙГОРОДСКАЯ<sup>1</sup>, А. ТУРЧИНОВИЧ<sup>2,3</sup>, И. М. ЦЫПИНА<sup>4,5</sup>, В. Г. ЗГОДА<sup>5</sup>, С. В. НИКУЛИН<sup>1,7</sup>, Д. В. МАЛЬЦЕВА<sup>1,5,\*</sup>

<sup>1</sup>Научно-технический центр «БиоКлиникум», Москва, 115088

<sup>2</sup>SciBerg e.Kfm, 68309 Germany

<sup>3</sup>Molecular Epidemiology C080, German Cancer Research Center, 69120 Germany

<sup>4</sup>Национальный исследовательский университет Высшая школа экономики, 101000, Москва

<sup>5</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997

<sup>6</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича, Москва, 119121

<sup>7</sup>Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, 690091

\*e-mail: dmaltseva@gmail.com

Поступила в редакцию 19.09.2019 г.

После доработки 15.10.2019 г.

Принята к публикации 29.10.2019 г.

Изучено цитотоксическое действие препаратов с разным механизмом действия, применяемых для лечения колоректального рака (5-фторурацила (5FU) и регорафениба (RF)) на клетки линии HT29 при культивировании на пластике и ламинине 521 (ЛМ-521). Впервые показано, что ЛМ-521 может способствовать увеличению чувствительности опухолевых клеток к действию 5FU. На основании анализа транскриптома и протеома, был предложен возможный механизм такого влияния ЛМ-521 на клетки колоректального рака HT29. Взаимодействие  $\beta$ 1-содержащих интегринов на поверхности клеток с ЛМ-521 может активировать FAK/PI3K/Akt сигнальные пути, способствовать фосфорилированию YAP-коактиватора транскрипции и его связыванию в комплекс с белком 14-3-3 $\sigma$ . Образование такого комплекса удерживает YAP в цитоплазме, препятствует его транспорту в ядро и активации транскрипции антиапоптотических генов.

**Ключевые слова:** апоптоз,  $\beta$ 1 интегрин, колоректальный рак, ламинин 521 (ламинин-11), регорафениб, 5-фторурацил, HT29, *ITGB1*, *LAMA5*, YAP, *SFN*, 14-3-3 $\sigma$ .

**doi:** 10.21519/0234-2758-2019-35-6-73-79

Компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ), окружающие опухолевые клетки, оказывают существенное влияние на скорость прогрессирования онкологических заболеваний [1]. Особого внимания заслуживает исследование влияния ВКМ на эффективность химиотерапии. Ламинины – основные строительные блоки базальной мембраны, ближайшего к клеткам слоя внекле-

точного матрикса. Взаимодействуя с рецепторами на поверхности клетки, ламинины способны запускать внутриклеточные сигналы, оказывающие влияние на различные процессы жизнедеятельности клетки и баланс между сигналами выживания и апоптоза [1]. Последнее может существенно влиять на эффективность химиотерапии. Было показано, что в случае колоректального

*Список сокращений:* ВКМ – внеклеточный матрикс; ЛМ-521 – ламинин 521; ОП – оптическая плотность; IC<sub>50</sub> – полумаксимальное ингибирование жизнеспособности клеток; RF – регорафениб; RIN (RNA integrity number) – параметр качества РНК; 5FU – 5-фторурацил.

рака высокая экспрессия гена *LAMA5*, кодирующего  $\alpha 5$ -цепь ламининов, ассоциирована с низким риском рецидива болезни после применения химиотерапевтических препаратов [2, 3].

Ламинины – семейство секреторных гетеротримерных гликопротеинов, состоящих из одной  $\alpha$ , одной  $\beta$  и одной  $\gamma$  цепи ( $\alpha\beta\gamma$ ) [4]. Среди ламининов, для которых ранее было показано модулирующее действие сигналов апоптоза отмечаются ламинин 332 [5–7], а также ламинины, содержащие  $\alpha 5$ -цепь (ламнин 511 и ламинин 521) [1, 8]. Ламинин 521 имеет свойство поддерживать жизнеспособность стволовых клеток и, по предварительным данным, влиять на выживаемость клеток колоректального рака [8–10].

Цель работы – оценить влияние ламинина 521 (ЛМ-521) на чувствительность клеток линии колоректального рака HT29 к химиотерапевтическим агентам. Клеточная линия HT29 является стандартной моделью в исследованиях колоректального рака и характеризуется наиболее эпителиальным фенотипом, по сравнению с другими линиями этого типа опухолей [11]. В качестве химиотерапевтических агентов использовались стандартные препараты, которые применяются для химиотерапевтического лечения колоректального рака: 5-фторурацил (5FU) и регорафениб (RF) (рис. 1). Механизмы цитотоксического действия выбранных химиотерапевтических агентов принципиально различаются. При попадании в клетку 5FU трансформируется в один из двух метаболитов – 5-фтор-2'-дезоксифуридин-5'-монофосфат или 5-фторуридин-5'-монофосфат, которые ингибируют активность фермента тимидилатсинтазы и нарушают синтез ДНК и РНК, что в свою очередь приводит к запуску апоптоза [12]. Цитотоксическое действие регорафениба основано на ингибировании активности широкого спектра киназ, в том числе Ras, Raf, MEK, ERK, а также активности рецепторов фактора роста эндотелия сосудов VEGFR1-3, ростового фактора PDGFR и др. [13, 14].

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Реактивы и материалы

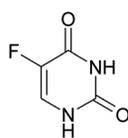
1×DPBS («ПанЭко», Россия); питательная среда для культивирования клеток McCoy's 5A (Gibco, США); фетальная бычья сыворотка FBS (Gibco); 100×раствор антибиотиков пенициллина и стрептомицина Pen Strep (Gibco); раствор трипсина-ЭДТА 0,25% с солями Хенкса («ПанЭко»); 5-фторурацил (Sigma, США); регорафениб (Abcam, США); раствор ламинина 521 0,1 мг/мл (BioLamina, Швеция); реагент для оценки жизнеспособности клеток МТТ (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) (AppliChem, Германия); культуральные флаконы и 96-луночные планшеты (TPP, Швейцария); ДМСО (Sigma, Германия); кит для колориметрического измерения количества белка Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США); N-гидроксиметиламинометан гидрохлорида (Tris-HCl) (AppliChem); двухзамещенная натриевая соль ЭДТА (AppliChem); 1,4-дифенилпирозин (ДФП) (Panreac, Германия); трис-(2-карбокситетил) – фосфин (ТСФ) (Sigma); иодацетоамид (Sigma); триэтиламмония бикарбоната (Sigma); кальция хлорида (AppliChem, Германия); трипсин (Promega, США); муравьиная кислота (Sigma); ацетонитрил (Sigma); хроматографическая колонна C18 Acclaim® PepMap™ RSLC с внутренним диаметром 75 мкм, (Thermo Fisher Scientific) длиной 15 см.

### Оценка влияния ламинина 521 на жизнеспособность клеток линии HT29 при действии химиотерапевтических агентов

Клетки линии HT29 культивировали в питательной среде McCoy's 5A с добавлением 10% FBS, 1×раствора антибиотиков пенициллина и стрептомицина по описанной ранее методике [15].

Оценку влияния ЛМ-521 на жизнеспособность клеток при действии химиотерапевтических агентов 5FU и RF при культивировании на пластике и на ламинине проводили так же, как

5-фторурацил



Регорафениб

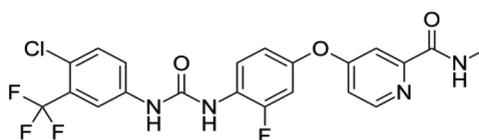


Рис. 1. Структура химиотерапевтических агентов 5FU и RF

Fig. 1. Chemical structures of chemotherapeutic agents used in the study

описано в работе [8] с некоторыми модификациями. Клетки линий HT29 рассаживали в лунки 96-луночного планшета, покрытые ЛМ-521 и без покрытия по 5000 клеток в лунку (в 100 мкл культуральной среды) и инкубировали при +37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 24 ч. Затем в каждую из лунок вносили по 10 мкл культуральной среды, содержащей 5FU или RF так, чтобы конечная концентрация химиотерапевтического агента составляла: 0, 0,1, 1, 4, 10, 40, 100, 250, 500 и 1000 мкМ, или 0, 0,01, 0,1, 0,5, 1, 4, 10, 50, 100 мкМ, соответственно. Клетки инкубировали в течение 120 ч и 48 ч, соответственно, при +37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. В случае 5FU через 72 ч среду из лунок отбирали, заменяли на свежую и сразу добавляли по 10 мкл раствора 5FU в такой же концентрации. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью реагента МТТ. Для этого в каждую лунку добавляли по 10 мкл раствора МТТ в DPBS с концентрацией 5 мг/мл и инкубировали в течение 4 ч. Затем среду из лунок полностью отбирали, образовавшуюся соль формазана растворяли в 150 мкл ДМСО. Измерения ОП проводили на планшетном спектрофлуориметре SpectroMax iD3 (Molecular Devices) при длине волны 570 нм. Представленные данные являются результатами двух независимых экспериментов. В каждом эксперименте все точки были поставлены в пяти повторностях.

Анализ кривых зависимостей выживаемости клеток от концентрации химиотерапевтических препаратов и расчет доз полумаксимального ингибирования жизнеспособности клеток (IC<sub>50</sub>) проводили как было описано ранее в [16] с помощью программы для статистической обработки данных RStudio и расширения программного пакета *drc* [17].

#### Анализ экспрессии генов с использованием микрочипов

Анализ профиля экспрессии генов в клетках линии HT29 проводили с помощью микрочипов Gene Chip Human Transcriptome Array 2.0 (Affymetrix, США). Выделение и анализ качества и количества РНК проводили по предыдущим работам [18, 19]. Значение параметра качества РНК (RNA integrity number, RIN) составило 9,5. Для синтеза кДНК брали 500 нг выделенной тотальной РНК. Все стадии подготовки образцов для гибридизации на микрочипы проводили в соответствии с протоколом производителя. Гибридизацию, промывание, окрашивание и сканирование микрочипов проводили по описанной ранее методике [20, 21]. Обработку CEL-файлов, полученных при ска-

нировании микрочипов, проводили с помощью программного пакета Transcriptome Analysis Console 2.0. Неаннотированные пробсыеты (наборы проб на микрочипе) были исключены из анализа. При оценке экспрессии генов в качестве порогового уровня сигнала на микрочипе было выбрано значение 6,0 в логарифмической шкале Affymetrix. Гены, для которых уровень сигнала был ниже, рассматривались как неэкспрессирующиеся.

#### Анализ протеома с помощью масс-спектрометрии

Клетки линии HT29 культивировались стандартным способом во флаконе 25 см<sup>2</sup> до состояния 80%-ной конfluence. Затем клетки снимали с поверхности флакона раствором трипсин-ЭДТА, центрифугировали, полученный осадок клеток промывали три раза в 10 мл DPBS. После последнего центрифугирования осадок с клетками замораживали в жидком азоте. Экстракцию тотального белка и гидролитическое расщепление проводили следующим образом. К пробам клеток (~ 6 млн), добавляли по 1 мл лизирующего буфера (рН 8,5) содержащего 3% натриевой соли дезоксихолиевой кислоты и 100 мМ Tris HCl (рН 7,4) и инкубировали во льду в течение 30 мин. Полученную суспензию обрабатывали ультразвуком с помощью прибора со щупом Bandelin Sonopuls (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Германия) при мощности 30% в течение 1 мин. Затем центрифугировали при 10000 об/мин и 4 °С. Супернатант отбирали и с помощью реагента BCA измеряли концентрацию общего белка. Объем пробы, содержащий 100 мкг белка, растворяли в денатурирующем буфере, содержащем 12 мМ натриевой соли дезоксихолиевой кислоты, 2 М тиомочевины, 2,5 мМ ЭДТА натриевой соли двухзамещенной и 75 мМ Tris-HCl (N-гидрокси-метиламинометан гидрохлорида, рН 8,2). Далее к полученному раствору добавляли 1,4-дителиотриэтол (ДТТ) и трис-(2-карбоксиил) – фосфин (ТСЕР) до конечной концентрации 87 мМ и 6,7 мМ, соответственно. После перемешивания пробу инкубировали при температуре 44 °С в течение 60 мин. В полученную пробу добавляли раствор иодацетоамида до конечной концентрации 50 мМ) и инкубировали в течение 60 мин в темном месте.

После восстановления и ацетилирования к пробе добавляли буфер для трипсинолиза (рН 8,0), состоящий из 42 мМ триэтиламмония бикарбоната и 3 мМ кальция хлорида и раствор трипсина (200 нг/мкл) в соотношении 1:100 по массовой доле содержащегося белка. После инкубации в

течение 2 ч при 37 °С к пробе добавляли 5 мкл концентрированной муравьиной кислоты, перемешивали и центрифугировали при 14000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость отбирали и анализировали масс-спектрометрическим методом.

Для масс-спектрометрического анализа полученной смеси 1 мкг пептидов в объеме 1 мкл наносили на хроматографическую колонну C18 со скоростью потока 0,3 мкл/мин в течение 12 мин в подвижной фазе С (2%-ный ацетонитрил, 0,1%-ная муравьиная кислота) и разделяли с помощью HPLC-хроматографии (Ultimate 3000 Nano LC System, Thermo Scientific). Элюцию пептидов проводили с использованием градиента буфера В (80% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота) со скоростью потока 0,3 мкл/мин. Общее время анализа составило 130 мин, включая: начальные 12 мин для уравнивания колонны буфером А (0,1% муравьиная кислота), градиент от 5 до 35% буфера В в течение 95 мин, 6 мин для достижения 99%-го буфера В, промывание в течение 10 мин 99%-ным буфером В и 7 мин для уравнивания колонки буфером А. Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре Q-exactive HFX в режиме положительной ионизации с использованием источника NESI (Thermo Scientific) с напряжением на эмиттере 2.1 кВ, температурой капилляра 240 °С. Панорамное сканирование проводили в диапазоне масс от 300 m/z до 1500 m/z, при разрешении 120,000. При тандемном сканировании разрешение устанавливали 15000 в диапазоне масс от 100 m/z до верхней границы, которая определяется автоматически исходя из массы прекурсора, но не более 2000 m/z. Изоляцию прекурсорных ионов проводили с окном изоляции  $\pm 1$  Да. Максимальное число разрешенных для изоляции ионов в режиме MS2 было установлено не более 40, с соблюдением границы отсечения при выборе прекурсора для тандемного анализа 50000 ед, а нормализованная энергия соударения (NCE) равнялась 29. Для тандемного сканирования учитывали только ионы с зарядом 2+...6+. Максимальное время накопления для прекурсорных ионов составило 50 мс, для фрагментных ионов – 110 мс. Величину AGC для прекурсоров и фрагментных ионов устанавливали  $1 \cdot 10^6$  и  $2 \cdot 10^5$ , соответственно. Все измеренные прекурсоры динамически исключались из тандемного MS/MS-анализа на 90-й с.

Количественную оценку содержания белков проводили с использованием программного обеспечения Progenesis IQ (Waters, США) с параметрами, предлагаемыми производителем.

Идентификацию белков проводили с помощью программы SearchGUI v.3.3.1 [22] и базы данных HumanDB (UniProt Release 2018\_05) со следующими поисковыми параметрами: расщепляющий фермент – трипсин, точность определения масс моноизотопных пептидов  $\pm 5$  мк/кг, точность определения масс в спектрах MS/MS  $\pm 25$  мк/кг и возможность пропуска одного сайта расщепления. Была учтена неизбежная модификация пептидов при алкилировании цистеинов и возможная модификация – при окислении метионинов. Частота встречаемости ложноположительных результатов для пептидов и белков <1%

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Оценка цитотоксического действия 5FU и RF

Для исследования влияние ЛМ-521 на чувствительность клеток линии колоректального рака HT29 к химиотерапевтическим агентам была проведена оценка цитотоксического действия 5FU и RF при культивировании клеток на пластике, покрытом ЛМ-521 и без покрытия. Проведенный анализ показал, что присутствие ЛМ-521 увеличивает чувствительность клеток линии HT29 к действию 5FU в 2,7 раза ( $p < 0,05$ ) (табл. 1). Однако в случае RF статистически значимого различия обнаружено не было. Таким образом, влияния ЛМ-521 на чувствительность клеток HT29 к цитостатикам с разным механизмом действия проявляется по-разному.

### Анализ профиля экспрессии генов и белков

Чтобы определить механизм повышения чувствительности клеток HT29 к 5FU, а также причины различного влияния ламинина 521 на

Таблица 1

### Влияние ЛМ-521 на чувствительность клеток HT29 к цитостатикам с разным механизмом действия

#### The effect of LM-521 on the sensitivity of HT29 cells to chemotherapeutics with different mechanisms of action

Условие культивирования	IC <sub>50</sub> , мкМ	
	5FU	RF
Пластик	237 ± 68	9,9 ± 3,6
Ламинин 521	87 ± 26	13,3 ± 4,7

*Примечание:* IC<sub>50</sub> – концентрация препаратов, соответствующая полумаксимальному ингибированию жизнеспособности клеток.

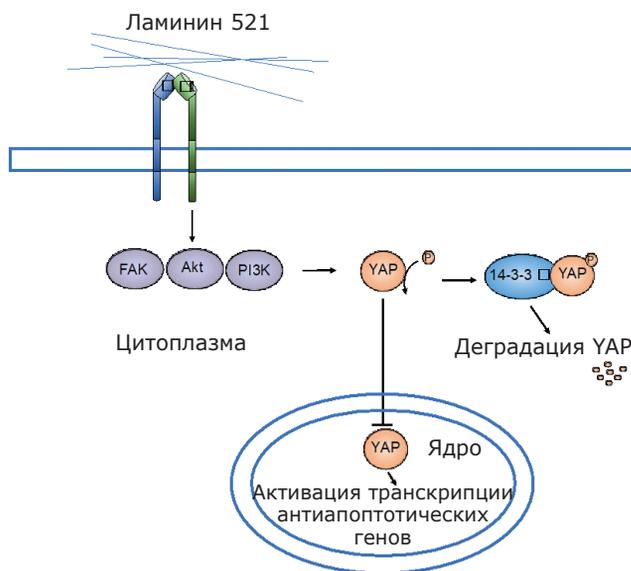
*Note:* IC<sub>50</sub> is a drug concentration corresponding to half-maximal inhibition of cell viability.

чувствительность клеток к действию цитостатиков разной природы, был проанализирован профиль экспрессии генов в исследуемых клетках с помощью микрочипов Affymetrix и профиль экспрессии белков с помощью масс-спектрометрического анализа. По данным транскриптома, в соответствии с выбранными критериями, указанными в разделе «Условия эксперимента», в качестве экспрессирующихся в клетках HT29 рассматривались 19445 генов. Проведенный анализ протеома позволил достоверно детектировать 1800 белков в клетках HT29.

**Возможный механизм влияния ламинина 521 на чувствительность клеток HT29 к химиотерапевтическим препаратам**

Основными рецепторами ламининов на поверхности клеток принято считать интегрины [1]. По данным транскриптома и протеома, в клетках HT29 экспрессируются цепи интегринов  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  и  $\beta 4$ , специфичные для ЛМ-521. По данным транскриптома в клетках HT29 также представлена цепь интегринов  $\alpha 3$ , что согласуется с ранее полученными данными [11]. Данные цепи могут сформировать димеры интегринов  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  и  $\alpha 6\beta 4$ . Известно, что при связывании  $\alpha 3\beta 1$  и  $\alpha 6\beta 1$  интегринов с ламининами, в том числе содержащими  $\alpha 5$ -цепь, могут активироваться киназы FAK, PI3K и Akt, которые в свою очередь способны запустить множество сигнальных реакций [1]. На примере кератиноцитов человека, было показано, что активация

FAK/PI3K/Akt сигнальных путей, опосредованная взаимодействием интегрин  $\alpha 3\beta 1$  с ламинином 332 способствует выживанию клеток посредством инактивации апоптоз-ассоциированных белков Bad и YAP. Механизм инактивации этих белков включает их фосфорилирование и последующее связывание в комплексы 14-3-3  $\zeta$ /p-Bad и 14-3-3  $\sigma$ /p-YAP. Образование таких комплексов приводит к удержанию Bad и YAP в цитоплазме и их последующей деградации. По данным транскриптома и протеома, в клетках HT29 экспрессируются обе упомянутые изоформы регуляторного белка 14-3-3. Белки Bad и YAP в протеоме детектировать не удалось, однако по данным микрочипов, экспрессия кодирующих их генов *BAD* и *YAP1* значительно отличается (до 50 раз), при этом экспрессия *YAP1* преобладает. Таким образом, в клетках HT29 при  $\beta 1$ -интегрин-ламинин опосредованном регулировании апоптоз-ассоциированных сигналов, более важная роль, по-видимому, принадлежит коактиватору транскрипции YAP. Важно, что YAP может выполнять, как антиапоптотическую, так и проапоптотическую функцию [23]. Так, комплекс YAP/p73 в ядре клетки активирует транскрипцию проапоптотических белков, а комплекс YAP/TEAD – антиапоптотических белков. Интересно, что в клетках HT29, уровень экспрессии гена белка p73 близок к нулевому, тогда как гены, кодирующие белки семейства TEAD (особенно *TEAD1* и *TEAD2*) экспрессируются на среднем уровне. Это согласуется с данными, что в кишечнике YAP выполняет антиапоптотическую функцию [23]. Суммируя все данные, можно предположить, что механизм, обуславливающий увеличение чувствительности клеток HT29 к действию 5FU в присутствии ЛМ-521, может представлять собой последовательность реакций: связывание  $\beta 1$ -интегринов с ЛМ-521 → активация FAK/PI3K/Akt сигнальных путей → образование комплекса 14-3-3  $\sigma$ /p-YAP → блокировка его антиапоптотического действия (рис. 2). Цитотоксическое действие RF для клеток HT29 оказывается, как минимум, на порядок более сильным. Возможно, что в случае этого препарата, проапоптотического влияния ЛМ-521 посредством ингибирования YAP-опосредованной транскрипции антиапоптотических белков оказывается недостаточно, и для проявленного действия необходимо более мощное вмешательство.



**Рис. 2.** Предполагаемый механизм увеличения чувствительности клеток колоректального рака HT29 к действию 5FU в присутствии ЛМ-521

**Fig. 2.** A possible mechanism for increasing the sensitivity of HT29 cells to 5FU in the presence of LM-521

Обобщая полученные данные, можно сделать следующие выводы. Впервые показана способность ЛМ-521 увеличивать чувствительность опухолевых клеток к действию цитостатического

агента. Таким образом, предсказанное нами ранее положительное влияние экспрессии  $\alpha 5$ -цепи ламининов на выживаемость больных колоректальным раком, может быть обусловлено в том числе их большей чувствительностью к химиотерапевтическому лечению препаратом 5FU, который рекомендован для первой линии химиотерапии [24].

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-14-01338).

Исследование протеома проводилось с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Протеом человека» (ИБМХ).

#### ЛИТЕРАТУРА

- Maltseva D.V., Rodin S.A. Laminins in metastatic cancer, *Mol. Biol.*, 2018, 52, 350–371.
- Leight J.L., Drain A.P., Weaver V.M. Extracellular Matrix remodeling and stiffening modulate tumor phenotype and treatment response. *Ann. Rev. Cancer Biol.*, 2017, 1, 313–334.
- Galatenko V.V., Maltseva D.V., Galatenko A.V., Rodin S., Tonevitsky A. G. Cumulative prognostic power of laminin genes in colorectal cancer. *BMC Med. Genomics.*, 2018, 11, 9.
- Domogatskaya A., Rodin S., Tryggvason K. Functional diversity of laminins. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2012, 28, 523–553.
- Marinkovich M.P. Tumour microenvironment: Laminin 332 in squamous-cell carcinoma. *Nat. Rev. Cancer*, 2007, 7, 370–380.
- Giannelli G., Azzariti A., Fransvea E., Porcelli L., Antonaci S., Paradiso A. Laminin-5 offsets the efficacy of gefitinib ('Iressa') in hepatocellular carcinoma cells. *Br. J. Cancer*, 2004, 91, 1964–9.
- Govaere O., Wouters J., Petz M., et al. Laminin-332 sustains chemoresistance and quiescence as part of the human hepatic cancer stem cell niche. *J. Hepatol.*, 2016, 64, 609–617.
- Maltseva D. V., Zakharova G.S., Rodin S.A., Tonevitsky A.G. The effect of laminins on chemoresistance of colorectal cancer cells. *Russ. Chem. Bull.*, 2018, 67, 2148–2151.
- Rodin S., Antonsson L., Niaudet C., et al. Clonal culturing of human embryonic stem cells on laminin-521/E-cadherin matrix in defined and xeno-free environment. *Nat. Commun.*, 2014, 5, 1–13.
- Rodin S., Antonsson L., Hovatta O., Tryggvason K. Monolayer culturing and cloning of human pluripotent stem cells on laminin-521-based matrices under xeno-free and chemically defined conditions. *Nat. Protoc.*, 2014, 9, 2354–2368.
- Maltseva D.V., Makarova J.A., Khristichenko A.Y., Tsykina I. M., Tonevitsky E. A., Rodin S.A. Epithelial to mesenchymal transition marker in 2D and 3D colon cancer cell cultures in the presence of laminin 332 and 411. *Mol. Biol.*, 2019, 53, 291–298.
- Longley D.B., Harkin D.P., Johnston P.G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer*, 2003, 3, 330–338.
- Wilhelm S.M., Dumas J., Adnane L., Lynch M., Carter C.A., Schütz G., Thierauch K.-H., Zopf D. Regorafenib (BAY 73-4506): A new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int. J. Cancer.*, 2011, 129, 245–255.
- Chen D., Wei L., Yu J., Zhang L. Regorafenib inhibits colorectal tumor growth through PUMA-mediated apoptosis. *Clin. Cancer Res.*, 2014, 20, 3472–84.
- Mal'tseva D.V., Makarova Y.A., Raigorodskaya M.P., Rodin S.A. Effects of laminins 332 and 411 on the epithelial-mesenchymal status of colorectal cancer cells. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2019, 166, 377–382.
- Tonevitsky A.G., Agapov I.I., Shamshiev A.T., Temyakov D.E., Pohl P., Kirpichnikov M.P. Immunotoxins containing A-chain of mistletoe lectin I are more active than immunotoxins with ricin A-chain. *FEBS Lett.*, 1996, 392, 166–168.
- Ritz C., Baty F., Streibig J.C., Gerhard D. Dose-response analysis using R. *PLoS One.*, 2015, 10, e0146021.
- Khaustova N.A., Maltseva D.V., Oliveira-Ferrer L., Stürken C., Milde-Langosch K., Makarova J.A., Rodin S., Schumacher U., Tonevitsky A.G. Selectin-independent adhesion during ovarian cancer metastasis. *Biochim.*, 2017, 142, 197–206.
- Krainova N.A., Khaustova N.A., Makeeva D.S., Fedotov N.N., Gudim E.A., Ryabenko E.A., Shkurnikov M.U., Galatenko V.V., Sakharov D.A., Maltseva D.V. Evaluation of potential reference genes for qRT-PCR data normalization in HeLa cells. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2013, 49, 743–749.
- Sakharov D.A., Maltseva D.V., Riabenko E.A., Shkurnikov M.U., Northoff H., Tonevitsky A.G., Grigoriev A.I. Passing the anaerobic threshold is associated with substantial changes in the gene expression profile in white blood cells. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 2012, 112, 963–972.
- Kudriaeva A., Galatenko V., Maltseva D., Khaustova N., Kuzina E., Tonevitsky A., Gabibov A., Belogurov A. The transcriptome of type I murine astrocytes under interferon-gamma exposure and remyelination stimulus. *Molecules*, 2017, 22, 808.
- Barsnes H., Vaudel M. SearchGUI: A highly adaptable common interface for proteomics search and de novo engines. *J. Proteome Res.*, 2018, 17, 2552–2555.
- Zhang X., Abdelrahman A., Vollmar B., Zechner D. The ambivalent function of YAP in apoptosis and cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, 19, 3770.
- Gill S., Dowden S., Colwell B., Collins L.L., Berry S. Navigating later lines of treatment for advanced colorectal cancer - Optimizing targeted biological therapies to improve outcomes. *Cancer Treat. Rev.*, 2014, 40, 1171–1181.

## Laminin 521 Modulates the Cytotoxic Effect of 5-Fluorouracil on Colorectal Cancer HT29 Cells

M. P. RAIGORODSKAYA<sup>1</sup>, A. TURCHINOVICH<sup>2,3</sup>, I. M. TSY PINA<sup>4,5</sup>, V. G. ZGODA<sup>6</sup>, S. V. NIKULIN<sup>1,7</sup>, and D. V. MALTSEVA<sup>1,5,\*</sup>

<sup>1</sup>*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

<sup>2</sup>*Scientific Research Center Bioclinicum, Moscow, 115088 Russia*

<sup>3</sup>*SciBerg e.Kfm, Mannheim, 68309 Germany*

<sup>4</sup>*National Research University Higher School of Economics, Moscow, 101000 Russia*

<sup>5</sup>*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, GSP-7 Moscow, 117997, Russia*

<sup>6</sup>*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, 119121 Russia*

<sup>7</sup>*Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690091 Russia*

\**e-mail: dmaltseva@gmail.com*

Received September 19, 2019

Revised October 15, 2019

Accepted October 29, 2019

**Abstract**—The cytotoxic effect of 5-fluorouracil (5FU) and regorafenib (RF)—drugs with different mechanisms of action used to treat colorectal cancer—on the HT29 cell line when cultured on plastic and laminin 521 (LM-521) has been studied. It was shown for the first time that LM-521 can increase the sensitivity of tumor cells to 5FU. Based on the analysis of the transcriptome and proteome, a possible mechanism of the observed effect of LM-521 on HT29 cell viability was proposed. The interaction of  $\beta$ 1-containing integrins on the cell surface with LM-521 can activate the FAK/PI3K/Akt signaling pathways, promote phosphorylation of the YAP transcription coactivator and its binding to a complex with the 14-3-3  $\sigma$  protein. The formation of such complex leads to the YAP retention in the cytoplasm, prevents its transport to the nucleus and the activation of anti-apoptotic gene transcription.

**Key words:** apoptosis,  $\beta$ 1 integrin, colorectal cancer, laminin 521 (laminin-11), regorafenib, 5-fluorouracil, HT29, *ITGB1*, *LAMA5*, YAP, *SFN*, 14-3-3  $\sigma$

**Funding**—The study was funded by the Russian Science Foundation (Project 17-14-01338).

**doi:** 10.21519/0234-2758-2019-35-6-73-79