

## УЧАСТИЕ ИНТЕГРИНА $\alpha 2\beta 1$ В МЕХАНИЗМЕ АНОИКИСА КЛЕТОК MCF-7 КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2015 Г.Е. Морозевич<sup>1</sup>, Н.И. Козлова<sup>1</sup>, П.А. Каралкин<sup>1</sup>,  
О.Ю. Сусова<sup>2</sup>, А.Е. Берман<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121  
Москва, ул. Погодинская, 10; факс: +7(495)708-3806,  
электронная почта: 1938berman@gmail.com

<sup>2</sup> РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 115478 Москва,  
Каширское шоссе, 24; факс: +7(499)324-1205,  
электронная почта: susovaolga@gmail.com

Поступила в редакцию 20.05.14

Блокирование экспрессии интегрин  $\alpha 2\beta 1$  в линии MCF-7 карциномы молочной железы существенно увеличивает чувствительность клеток к субстрат-зависимому апоптозу (аноикису) и резко тормозит их клонообразующую активность. Торможение экспрессии  $\alpha 2\beta 1$  сопровождается, с одной стороны, увеличением продукции апоптогенного белка p53 и ингибитора циклин-зависимых протеинкиназ – белка p27 и, с другой – уменьшением продукции антиапоптогенного белка Bcl-2 и полифункционального белка cMyc. Снижение в клетках  $\alpha 2\beta 1$  не влияет на активность протеинкиназы Akt, но резко увеличивает активность киназы Erk1/2. Торможение последней не влияет на аноикис контрольных клеток, однако снижает до их уровня аноикис клеток с заблокированным  $\alpha 2\beta 1$ . Полученные результаты впервые свидетельствуют, что интегрин  $\alpha 2\beta 1$  участвует в защите опухолевых клеток от аноикиса через механизм, основанный на ингибировании сигнальной протеинкиназы Erk.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** интегрин, аноикис, опухолевый рост, сигнальные протеинкиназы.

Рост и злокачественная прогрессия опухолевых клеток существенно зависят от их «взаимоотношения» с внеклеточным матриксом (ВНМ). Характерным свойством злокачественного фенотипа является рост клеток в условиях нарушения матрикс-клеточных контактов. В нормальных клетках разрыв связей с матриксом индуцирует стрессовую реакцию, которую они не могут преодолеть и погибают по механизму апоптоза, получившего название субстрат-зависимого апоптоза (аноикиса). Ранней и ключевой стадией опухолевой прогрессии является формирование в клетках механизма, который блокирует аноикис [1–3].

Экспериментальные данные свидетельствуют, что ВНМ участвует в регулировании всех этапов онкогенной трансформации. Этот контроль осуществляется с помощью механизма сигналинга – последовательной передачи сигналов от макромолекул матрикса через цепь посредни-

ков к геному клетки и изменения активности генов. Ключевыми посредниками в указанной цепи являются интегрин – рецепторы клеточной мембраны, непосредственно связанные с белками матрикса и иницирующие сигналин. Результаты множества исследований показывают, что интегрин участвуют в механизмах базисных физиологических реакций клетки (пролиферации, движении, дифференцировке, апоптозе и др.), модификации которых лежат в основе роста и прогрессии опухолей [4–7].

Интегрин представляют большое семейство – около 20 членов, каждый из которых является гетеродимером, состоящим из  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей, связанных нековалентными связями. Интегриновые рецепторы различаются по лигандной специфичности и уровню экспрессии в тканях млекопитающих. Наиболее распространены и жизненно важными для клеток являются фибронектин-связывающий интегрин  $\alpha 5\beta 1$ , коллаген-связывающий рецептор  $\alpha 2\beta 1$ , а также интегрин  $\alpha \nu \beta 3$  с более широкой лигандной специфичностью. Эти рецепторы составляют предмет подавляющего большинства исследований, направленных на выяснение роли интегрин-

Принятые сокращения: ВНМ – внеклеточный матрикс, мшРНК – малые шпилечные РНК, поли-ГЕМА – полигидроксиметилметакрилат.

\* Адресат для корреспонденции.

опосредованного сигналинга в росте и прогрессии опухолей [8–10].

Результаты исследований отдельных интегринов во многом противоречивы. Это связано с многообразием интегринового семейства и сигнальных путей, которые могут индуцировать одни и те же рецепторы в разных клетках. Так, в наших работах была выявлена ранее не описанная роль интегрин  $\alpha\beta3$  в клеточных линиях карциномы кишечника человека и онкотрансформированных фибробластов хомячка. В отличие от большинства исследованных опухолевых линий, в указанных клетках  $\alpha\beta3$  стимулировал апоптоз [11, 12]. В недавней работе, посвященной сигналингу рецептора  $\alpha5\beta1$ , нами было впервые продемонстрировано, что интегрин  $\alpha5\beta1$  участвует в регулировании роста клеток эпидермоидной карциномы путем активации рецептора эпидермального фактора роста и ингибирования их апоптотической гибели [13].

Роли интегрин  $\alpha2\beta1$  в апоптозе опухолевых клеток посвящено небольшое число исследований, результаты которых неоднозначны. Наряду с доказательствами участия этого рецептора в защите клеток от апоптоза опубликованы данные, указывающие на его апоптогенную активность в некоторых типах клеток [14–16]. Возможное объяснение состоит в том, что  $\alpha2\beta1$ , как и другие интегрины, может инициировать в разных клетках (в зависимости от физиологического статуса, стадии развития, взаимодействия с внешними и внутренними факторами и т.д.) сигнальные механизмы, контролируемые разнонаправленные клеточные реакции. Сигнальные пути, инициируемые рецептором  $\alpha2\beta1$ , исследованы слабо. В настоящей работе впервые показано, что интегрин  $\alpha2\beta1$  участвует в защите от апоптоза клеток карциномы молочной железы человека через механизм, основанный на ингибировании сигнальной протеинкиназы Erk.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Клетки и реагенты.** Линия MCF-7 клеток карциномы молочной железы человека получена в банке ATCC (США). Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% сыворотки эмбрионов коров, 2 мМ L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, при 37° в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. В работе использовали также реагенты фирмы «Sigma» (США), за исключением специально оговоренных случаев. Поликлональные антитела к  $\alpha2$ -интегриновой субъединице и моноклональные антитела к интегрину  $\alpha2\beta1$  получены, соответственно, от фирм «Chemicon» и «BD PharMingen» (США).

Поликлональные антитела к протеинкиназам Akt, Erk и их фосфорилированным формам (pAkt Ser473 и pErk Thr202/Tyr204) получены от фирмы «Cell Signaling Tech» (США), ингибитор киназы Erk – соединение PD98059 – от «Calbiochem» (США).

**Трансдукция клеток мшРНК.** Бактериальные глицериновые клоны NM\_002203.2-1427s1c1 (#D3) и NM\_002203.3-1561s21c1 (#D7), содержащие лентивирусный плазмидный вектор pLKO.1-пуго с мшРНК для  $\alpha2$ -интегриновой субъединицы, были куплены у фирмы «Sigma» (США). pLKO.1-пуго – лентивирусный вектор без мшРНК («пустой» вектор) – был использован в качестве контроля. Лентивирусные частицы продуцировали в клетках HEK293T путем котрансфекции вектора, содержащего мшРНК, или контрольного вектора с пакующими плазидами, как описано ранее [13]. Клетки инфицировали лентивирусом в присутствии 8 мг/мл полибрена и проводили селекцию пурамицином (1–2 мг/мл) в течение 4–6 дней.

**Субстрат-зависимый апоптоз (аноиксис)** оценивали по накоплению клеток с содержанием ДНК, меньшим, чем у диплоидных клеток (суб-G1 популяция) после их пассирования на неадгезивном субстрате – полигидроксиметилметакрилате (поли-ГЕМА) [17]. Субстрат приготавливали в 6-луночных планшетах по описанной ранее процедуре [17]. 2 × 10<sup>5</sup> клеток вносили в лунку и инкубировали в среде, содержащей 10% эмбриональной сыворотки, при 37° в течение 24 ч, после чего клетки обрабатывали для цитофлуориметрии.

**Колониеобразование.** 2000 клеток пассировали в 1%-ном геле метилцеллюлозы в полной среде в чашках Петри в течение 14 дней. Колонии окрашивали кристалвиолетом. Чашки с колониями сканировали.

**Цитофлуориметрия.** 3–5 × 10<sup>5</sup> клеток фиксировали в 70%-ном этаноле, промывали фосфатно-солевым буфером, добавляли 1 мл раствора иодида пропидия (50 мкг/мл) в цитратном буфере и 50 мкл раствора РНКазы А (10 мкг/мл) и инкубировали 3 ч при 4°. Для анализа экспрессии интегрин  $\alpha2\beta1$  на клеточной поверхности клетки инкубировали с антителами к  $\alpha2\beta1$  («BD PharMingen», США), окрашивали ФИТЦ-конъюгированными вторыми антителами и фиксировали в 2%-ном формальдегиде. Анализ клеток проводили в проточном цитофлуориметре «Becton Dickinson» (США).

**Электрофорез в ПААГ и иммуноблоттинг** проводили по описанной процедуре [18]. Клетки экстрагировали 50 мМ Tris-HCl-буфером (рН 7,5), содержащим 1%-ный Тритон X-100, 150 мМ NaCl, 0,5%-ный дезоксихолат натрия, 0,1%-ный

Ds-Na, а также смесь протеазных и фосфатазных ингибиторов («Santa Cruz Biotech», США) из расчета 1 мкл каждой смеси на  $10^6$  клеток, и центрифугировали 10 мин при 13 000 g. 30 мкг белков клеточного лизата разделяли с помощью электрофореза в Ds-Na-ПААГ и подвергали электропереносу на мембрану из поливинилиденфторида (ПВДФ). После инкубации с антителами мембрану обрабатывали вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой, проявляли в системе ECL («Amersham», Англия), экспонировали с рентгеновской пленкой и сканировали.

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

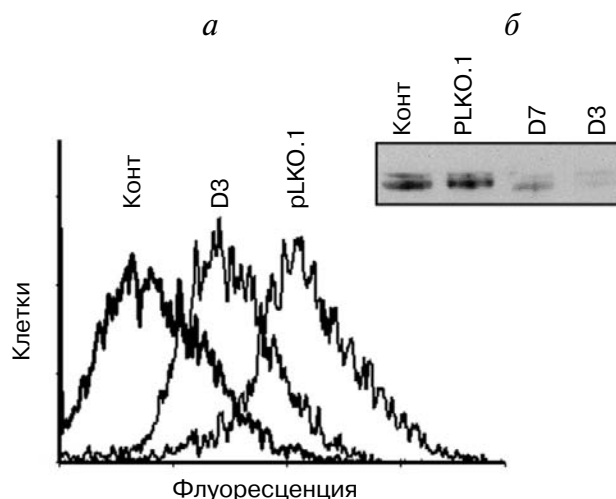
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Блокирование сигналинга интегрин  $\alpha 2\beta 1$  снижает резистентность к аноикису и клонообразующую активность клеток MCF-7.** Сигналинг интегрин  $\alpha 2\beta 1$  блокировали путем подавления его экспрессии  $\alpha 2$ -специфической мшРНК. При исследовании двух плазмидных клонов, экспрессирующих  $\alpha 2$  мшРНК, оказалось, что клон D3 более эффективен в блокировании экспрессии указанного рецептора: по результатам вестерн-блоттинга содержание интегрин в лизате клеток, трансдуцированных этим клоном, уменьшалось по сравнению с контрольными клетками на 70%, а по данным цитофлуориметрии поверхностная экспрессия рецептора снижалась в 2,5–3 раза (рис. 1). Дальнейшие исследования были проведены с более эффективным клоном.

Участие  $\alpha 2\beta 1$  в стрессе, индуцированном разрывом матрикс-клеточных контактов, оценивали по влиянию блокирования экспрессии этого рецептора на аноикис. Представленные на рис. 2 данные показывают, что снижение экспрессии  $\alpha 2\beta 1$  в клетках MCF-7, сохранивших связь с субстратом, не влияет на их апоптотическую гибель (рис. 2, а). Однако культивирование клеток со сниженным уровнем  $\alpha 2\beta 1$  на неадгезивном субстрате повышает их апоптоз (рис. 2, б). При этом если в контрольных культурах (трансдуцированных «пустой» плазмидой) уровень аноикиса относительно невелик (порядка 15%), то трансдукция вектором, экспрессирующим  $\alpha 2$  мшРНК, повышает содержание апоптотических клеток примерно до 30% популяции.

Одним из характерных признаков опухолевой активности клеток является их способность к росту в полужидких средах с образова-

нием колоний (клонообразующая активность). Условием ее развития является резистентность к аноикису, однако приобретение этого свойства зависит от степени резистентности [19]. Для оценки роли интегрин  $\alpha 2\beta 1$  в онкогенной активности клеток MCF-7 исследовали влияние торможения его экспрессии на образование колоний при росте в геле агарозы. Как видно из рис. 3, анализируемая линия обладает выраженной клонообразующей активностью, что соответствует высокой устойчивости этих клеток к аноикису (рис. 2). Из этого же рисунка видно, что блокирование экспрессии интегрин  $\alpha 2\beta 1$  приводит примерно к трехкратному снижению количества колоний, сформированных в геле агарозы после 14 дней роста на этом субстрате. Этот результат соответствует эффекту, оказываемому торможением экспрессии  $\alpha 2\beta 1$  на резистентность указанных клеток к субстрат-зависимому апоптозу.

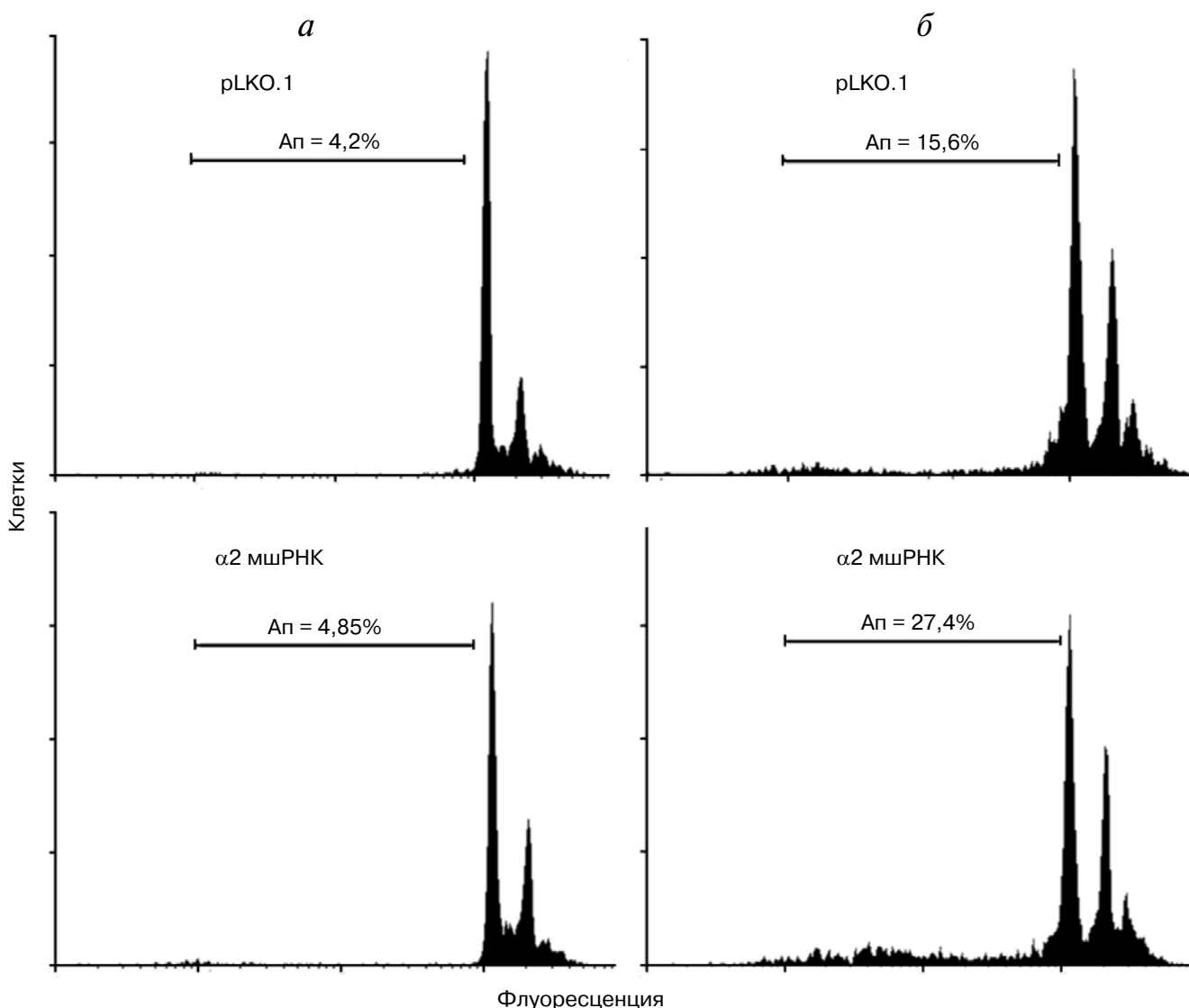


**Рис. 1.** Трансдукция клеток MCF-7  $\alpha 2$ -специфической мшРНК эффективно блокирует экспрессию интегрин  $\alpha 2\beta 1$ . Клетки инфицировали лентивирусом с плазмидным вектором pLKO.1 (клоны D3, D7), содержащим  $\alpha 2$  мшРНК, или pLKO.1, не содержащим  $\alpha 2$  мшРНК («пустым» вектором), и проводили селекцию пуромицином. а – Цитофлуориметрический анализ поверхностной экспрессии  $\alpha 2\beta 1$ . Конт – клетки трансдуцированы «пустым» pLKO.1 и окрашены ФИТЦ-конъюгированными антителами к иммуноглобулинам мыши; D3 – клетки трансдуцированы клоном D3 pLKO.1, содержащим  $\alpha 2$  мшРНК, обработаны моноклональными антителами к  $\alpha 2\beta 1$  и окрашены ФИТЦ-конъюгированными антителами к иммуноглобулинам мыши; pLKO.1 – клетки трансдуцированы «пустым» вектором, обработаны и окрашены, как в случае D3; б – иммуноблоттинг белков клеточного лизата. 30 мкг белков лизата разделяли электрофорезом в ПААГ, проводили электроперенос и окрашивали первыми и вторыми антителами. Конт – интактные клетки; pLKO.1 – клетки трансдуцированы «пустым» вектором; D3, D7 – клетки трансдуцированы клонами, содержащими  $\alpha 2$  мшРНК

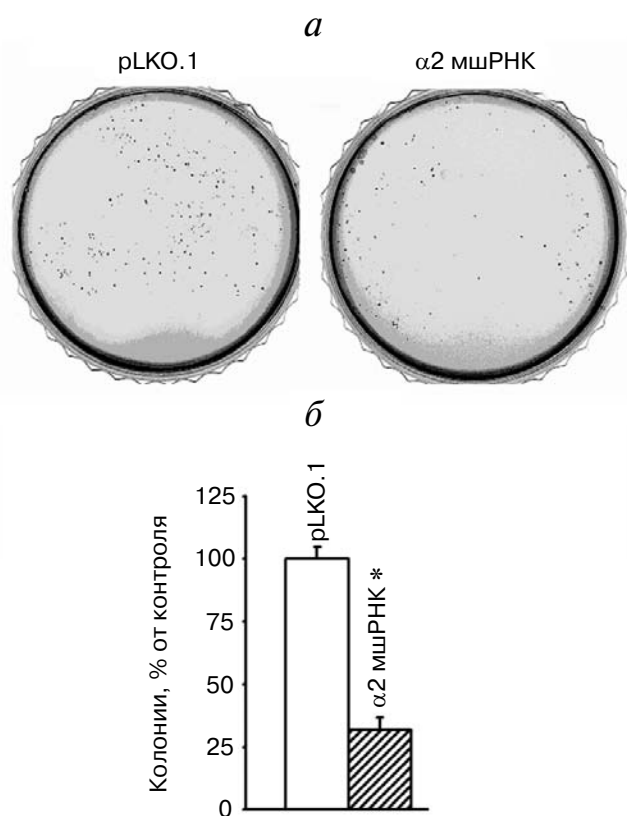
**Сигнальные пути, опосредующие эффекты блокирования интегрин  $\alpha 2\beta 1$ .** Для выяснения механизмов, опосредующих действие интегрин  $\alpha 2\beta 1$  на апоикс, анализировали экспрессию белков, которые участвуют в сигналинге и контролируют физиологические функции клеток. Как видно из рис. 4, торможение экспрессии  $\alpha 2\beta 1$  приводит к резкому усилению экспрессии апоптогенного белка p53 и снижению экспрессии антиапоптогенного белка Bcl-2. Кроме того, существенно увеличивается экспрессия ингибитора клеточного цикла – белка p27 и снижается

экспрессия белка c-тус. Оба белка выполняют важные функции в механизмах пролиферации и выживания клеток [20, 21].

Перечисленные выше белки контролируют события, которые происходят в клеточных ядрах, т.е. на завершающих стадиях проведения сигналов, источником которых, кроме интегринов, могут быть различные рецепторы клеточной поверхности и внутриклеточные метаболиты. Более специфическими для интегринов являются предшествующие этапы, инициируемые в клеточной мембране. Среди них наиболее пол-



**Рис. 2.** Трансдукция  $\alpha 2$  мшРНК усиливает апоикс клеток MCF-7. Клетки, трансдуцированные «пустой» плазмидой (pLKO.1) или содержащей  $\alpha 2$  мшРНК, пассировали в течение 24 ч при 37° в среде, содержащей 10% эмбриональной сыворотки, в 6-луночных планшетах, не обработанных (а) или покрытых неадгезивным субстратом – поли-ГЕМА (б), после чего клетки обрабатывали для цитофлуориметрии. Приведены типичные гистограммы. Ап – апоптотические клетки, горизонтальные линии – область клеток с субдиплоидным (суб-G1) содержанием ДНК. Приведено содержание апоптотических клеток (%) в общей клеточной популяции

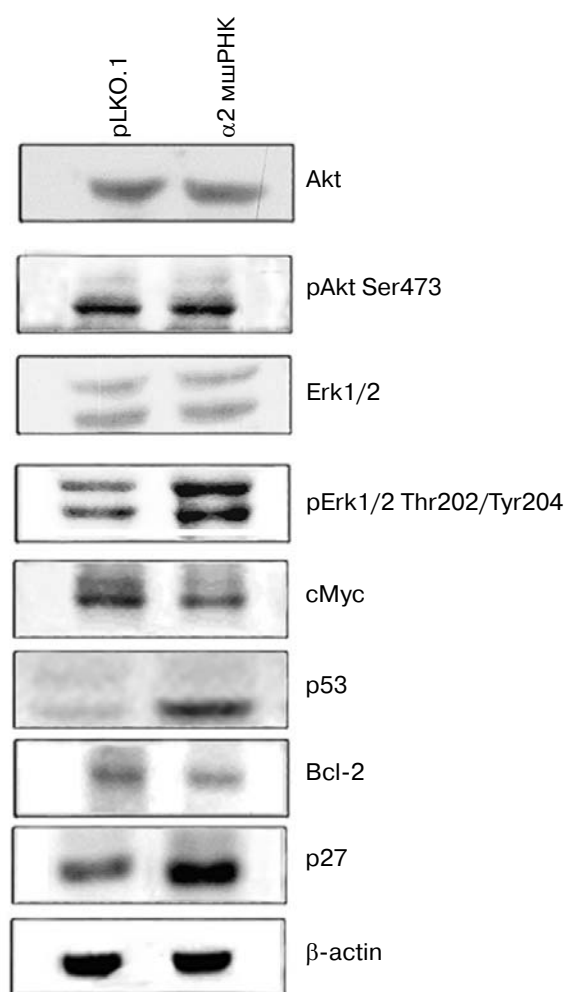


**Рис. 3.** Трансдукция  $\alpha 2$  мшРНК снижает клонообразующую активность клеток МСF-7. Клетки, трансдуцированные «пустым» вектором (pLKO.1) или вектором, содержащим  $\alpha 2$  мшРНК, пассировали в полужидкой агарозе в течение 14 дней. Колонии на чашках Петри окрашивали кристаллвиолетом, сканировали и подсчитывали количество колоний. Число колоний, образованных клетками с «пустым» вектором принято за 100%. *а* – Результаты типичного опыта; *б* – результаты трех независимых опытов ( $M \pm S.E.$ ), \*  $p < 0,002$

но охарактеризованы пути, опосредуемые протеинкиназами IP3-K/Akt и семейством MAPK киназ, в том числе киназой Erk [13, 22, 23]. Для выяснения участия этих путей в сигналинге, инициированном интегрином  $\alpha 2\beta 1$  в клетках МСF-7, исследовали изменение экспрессии и активности фосфокиназ Akt и Erk1/2 (изомеры Erk с молекулярными массами 42 и 44 кДа) при блокировании экспрессии  $\alpha 2\beta 1$ . Экспрессию киназ оценивали с помощью иммуноблоттинга белков клеточного лизата с использованием антител к общему белку фермента, а активность – с использованием антител, специфических к его активным (фосфорилированным) формам. Оказалось (рис. 4), что снижение уровня  $\alpha 2\beta 1$  не влияет на экспрессию и активность киназы Akt и экспрессию Erk1/2. Из этих данных можно заключить (по крайней мере, предварительно),

что в исследуемой модели Akt-опосредованный путь не участвует в проведении  $\alpha 2\beta 1$ -иницированных сигналов, контролирующих аноикис.

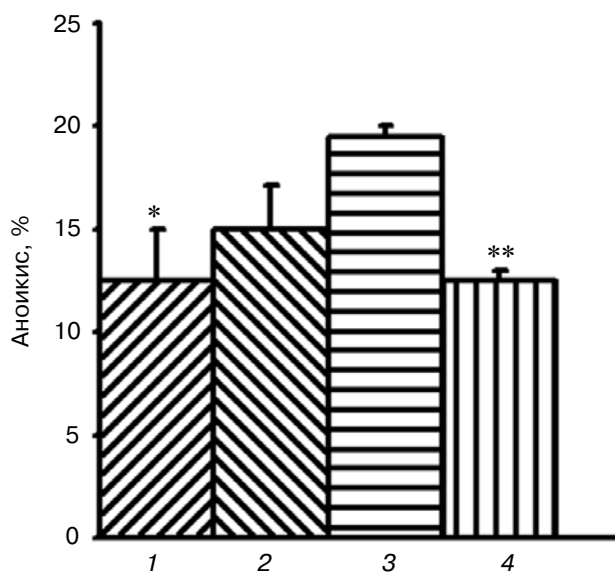
Однако при анализе Erk обнаружили резкое повышение активности обоих ее изомеров в ответ на снижение экспрессии  $\alpha 2\beta 1$ . Этот результат противоречит данным многих исследований, показавших ключевую роль Erk в поддержании жизнеспособности и пролиферативной активности клеток различных типов, в частности в повышении их резистентности к аноикису [23–25]. В то же время в ряде работ, выполненных на различных клеточных моделях, продемонстрирована апоптоз-стимулирующая активность Erk [26–28].



**Рис. 4.** Влияние блокирования экспрессии интегрин  $\alpha 2\beta 1$  на экспрессию сигнальных белков в клетках МСF-7. Клетки трансдуцировали «пустым» вектором или вектором, содержащим  $\alpha 2$  мшРНК, лизировали и 30 мкг белка клеточного лизата разделяли электрофорезом в 7,5%-ном Ds-Na-ПААГ с последующим иммуноблоттингом. Мембрану инкубировали с антителами к указанным белкам в разведении 1 : 1000 (в случае cMyc – 1 : 300)

В свете этих сведений можно было предположить, что: 1) обнаруженное увеличение активности Erk является сопутствующим признаком, не имеющим прямого отношения к апоптозу, индуцированному блоком  $\alpha 2\beta 1$ ; 2) стимуляция апоптоза, вызванная указанной модификацией  $\alpha 2\beta 1$ , реализуется через повышение активности Erk.

Для проверки этих альтернатив исследовали действие PD98059 – специфического ингибитора Erk1/2 – на клетки со сниженной экспрессией  $\alpha 2\beta 1$  в сравнении с клетками с исходным уровнем этого рецептора (рис. 5). Видно, что обработка ингибитором контрольной клеточной популяции (с высоким уровнем экспрессии  $\alpha 2\beta 1$ ) практически не влияет на апоптоз, индуцированный разрывом связей клеток с субстратом. В популяции с заблокированным  $\alpha 2\beta 1$  уровень апоптоза увеличивался по сравнению с контролем на 60% – в соответствии с данными, представленными на рис. 2. Однако ингибирование активности Erk1/2 в этих клетках сопровождалось снижением апоптоза до уровня контроля.



**Рис. 5.** Ингибирование протеинкиназы Erk снижает апоптоз клеток MCF-7, индуцированный блокированием экспрессии интегрин  $\alpha 2\beta 1$ . Клетки, трансдуцированные «пустой» плазмидой (1, 2) или плазмидой, содержащей  $\alpha 2$  мшРНК (3, 4), пассировали в течение 24 ч при 37° в среде, содержащей 10% эмбриональной сыворотки, в 6-луночных планшетах, обработанных поли-ГЕМА. 2, 4 – Клетки перед пассированием на поли-ГЕМА инкубировали в течение 24 ч при 37° в среде, содержащей 25 мкМ PD98059. Апоптоз определяли с помощью цитофлуориметрического анализа. \*  $p < 0,05$  относительно 3; \*\*  $p < 0,02$  относительно 3

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании показано, что в клетках MCF-7 карциномы молочной железы интегрин  $\alpha 2\beta 1$  выполняет функцию защиты от субстрат-зависимого апоптоза (апоптоза). Впервые установлено, что этот рецептор инициирует механизм защиты, основанный не на активации, а на ингибировании фосфокиназы Erk. Это наблюдение, пока не описанное для других интегринов, является неожиданным, поскольку фосфокиназа Erk – представитель семейства митогенактивируемых фосфокиназ – давно известна как стимулятор пролиферации и жизнеспособности клеток. Опубликованные сведения о роли  $\alpha 2\beta 1$  и других рецепторов интегрина семейства в механизмах апоптоза, в частности апоптоза, немногочисленны и противоречивы. Один и тот же рецептор в разных клеточных моделях оказывал противоположный эффект на резистентность к апоптозу. Так, резистентность клеток острой миелоидной лейкемии к апоптозу обусловлена активацией экспрессированного на клеточной поверхности интегрин  $\alpha 4\beta 1$  [29]. Напротив, в клетках остеосаркомы активация этого рецептора уменьшала резистентность к субстрат-зависимому апоптозу [30]. Продемонстрирована ключевая роль интегрин  $\alpha 5\beta 1$  в устойчивости к апоптозу клеток рака молочной железы и желудка [8, 31]. Однако в аналогичной модели (клетки карциномы желудка) [32], а также в модели клеток карциномы поджелудочной железы [33] резистентность к апоптозу наблюдала не при усилении, а ингибировании активности  $\alpha 5\beta 1$ .

Столь же неоднозначны результаты исследований, посвященных интегрин  $\alpha 2\beta 1$ . Апоптоз, индуцированный в клеточной линии рака желудка одним из лектинов, обусловлен его взаимодействием и интернализацией  $\alpha 2\beta 1$  (т.е. нейтрализацией сигнальной активности рецептора) [15]. Этот результат, свидетельствующий об антиапоптотической функции  $\alpha 2\beta 1$  в указанной модели, не согласуется с исследованиями Ферраро с соавт. [16], проведенными на клетках рака прямой кишки. В данной работе показано, что подавление экспрессии гистонметилтрансферазы индуцирует апоптоз с одновременным усилением экспрессии интегрин  $\alpha 2\beta 1$ , что косвенно указывает на стимулирующее апоптоз действие этого рецептора.

Неоднозначность результатов исследований, посвященных роли интегринов в субстрат-зависимом апоптозе, скорее всего, связана с участием этих рецепторов во множестве сигнальных цепочек (сигналинге), которые они разделяют с другими рецепторами и которые могут контро-

лизовать разнонаправленные клеточные реакции (пролиферацию и остановку деления, старение и апоптоз и др.) [34–36].

Исследования интегрин-иницируемого сигналинга при стрессе, вызываемом аноикисом, представлены единичными публикациями. В работе Матсунага с соавт. [29] было показано, что в лейкемических клетках резистентность к аноикису реализуется путем активации интегрин  $\alpha 4\beta 1$  через сигнальный путь PI-3K/Akt и активирование антиапоптозного белка Bcl-2. В клетках карциномы молочной железы аналогичное свойство было обнаружено у рецептора  $\alpha 5\beta 1$  [8]. Однако инициируемые им сигналы передавались через цепь киназ Mek–Erk и завершались супрессией апоптогенного белка Vim.

В приведенной выше работе Ферраро с соавт. [16] было продемонстрировано, что ингибирование фосфокиназ Akt и Erk инициирует аноикис клеток нескольких линий карциномы кишечника с одновременным повышением экспрессии  $\alpha 2\beta 1$ , которое и ответственно за гибель клеток. Предполагается, что свойственная этим линиям гиперактивность Akt/Erk-сигнальных путей обеспечивает постоянно высокий уровень экспрессии гистонметилтрансферазы, которая блокирует экспрессию  $\alpha 2\beta 1$  и, благодаря этому, усиливает резистентность к аноикису. Однако в работе не приведены доказательства того, что гиперэкспрессия  $\alpha 2\beta 1$  является причиной гибели клеток, а не побочным эффектом ингибирования фосфокиназ.

Принципиальный интерес представляет способность фосфокиназы Erk стимулировать не

выживание, а гибель клеток. Как указывалось, участие Erk в качестве стимулятора аноикиса, индуцированного супрессией интегрина рецептора, описано впервые в настоящей работе. Однако это свойство киназы Erk ранее описано во многих моделях клеточной гибели, вызванной разнообразными апоптогенными стимулами. Так, в линии MCF-7 наблюдали существенное снижение цитотоксического эффекта противоопухолевого цитостатика таксола при блокировании сигнального пути Ras/Raf/Erk [37]. Апоптогенные функции указанного пути отмечали в различных клеточных моделях при исследовании цитотоксического действия этопозида [38], доксорубина [39], цисплатина [40] и др. Описанное свойство Erk наблюдали при исследовании обоих основных механизмов апоптоза – внутреннем (intrinsic) и наружном (extrinsic) [28].

Природа механизмов, определяющих разнонаправленный характер действия Erk на клеточную гибель, остается невыясненной. Предполагается, что существенное значение имеет внутриклеточная локализация Erk: при транслокации в ядро киназа индуцирует сигналы, направленные на апоптоз [27]. В качестве важного условия в дополнение к внутриклеточной локализации рассматривается длительное нахождение киназы в активированном состоянии [27]. Однако эти гипотезы требуют более детального экспериментального обоснования.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 12-04-01653, 14-04-00783).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Frish, S.M., and Srean, R.A. (2001) Anoikis mechanism, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **13**, 555–562.
- Zhan, M., Zhao, H., and Han, Z.C. (2004) Signalling mechanisms of anoikis, *Histol. Histopathol.*, **19**, 973–983.
- Jenning, S., Pham, T., Ireland, S.K., Ruoslahti, E., and Biliran, H. (2013) Bit1 in anoikis resistance and tumor metastasis, *Cancer Lett.*, **333**, 147–151.
- Guo, W., and Giancotti, F.G. (2004) Integrin signalling during tumour progression, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 816–826.
- Hehlhans, S., Haase, M., and Cordes, N. (2007) Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies, *Biochim. Biophys. Acta*, **1775**, 163–180.
- Desgrosellier, J.S., and Cheresh, D.A. (2010) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities, *Nature Rev. Cancer*, **10**, 9–22.
- Kuphal, S., Bauer, R., and Bosserhof, A.K. (2005) Integrin signaling in malignant melanoma, *Cancer Metastasis Rev.*, **24**, 195–222.
- Haenssen, K.K., Caldwell, S.A., Shahriari, K.S., Jackson, S.R., Whelan, K.A., Klein-Szanto, A.J., and Reginato, M.J. (2010) ErbB2 requires integrin alpha 5 for anoikis resistance via Src regulation of receptor activity in human mammary epithelial cells, *J. Cell Sci.*, **123**, 1373–1382.
- Bai, J., Zhang, J., Wu, J., Shen, L., Zeng, J., Ding, J., Wu, Y., Gong, Z., Li, A., Xu, S., Zhou, J., and Li, G. (2010) JWA regulates melanoma metastasis by integrin avb3 signaling, *Oncogene*, **29**, 1227–1237.
- Tran, T., Barlow, B., O’Rear, L., Jarvis, B., Li, Z., Dickson, K., Dupont, W., and Zutter, M. (2011) Loss of the  $\alpha 2\beta 1$  integrin alters human papilloma virus-induced squamous carcinoma progression *in vivo* and *in vitro*, *PLoS One*, **6**, e26858.
- Kozlova, N.I., Morozovich, G.E., Chubukina, A.N., and Berman, A.E. (2001) Integrin alpha-v/beta-3 promotes anchorage-dependent apoptosis in human intestinal carcinoma cells, *Oncogene*, **20**, 4710–4717.
- Kozlova, N.I., Morozovich, G.E., Shtil, A.A., and Berman, A.E. (2004) Multidrug-resistant tumor cells with decreased malignancy: a role for integrin alpha-v/beta-3, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **316**, 1173–1177.
- Morozovich, G.E., Kozlova, N.I., Ushakova, N.A., Preobrazhenskaya, M.E., and 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, N.Y.)*, **4**, 368–374.
14. Niland, S., Cremer, A., Fluck, J., Eble, J.A., Krieg, T., and Sollberg, S. (2001) Contraction-dependent apoptosis of normal fibroblasts, *J. Invest. Dermatol.*, **116**, 686–692.
  15. Sato, Y., Morimoto, K., Kubo, T., Yanagihara, K., and Seyama, T. (2012) High mannose-binding antiviral lectin PFL from *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 promotes cell death of gastric cancer cell MKN28 via interaction with  $\alpha 2$ -integrin, *PLoS One*, **7**, e45922.
  16. Ferraro, A., Mourtzoukou, D., Kosmidou, V., Avlonitis, S., Kontogeorgos, G., Zografos, G., and Pintzas, A. (2013) EZH2 is regulated by ERK/AKT and targets integrin  $\alpha 2$  gene to control epithelial–mesenchymal transition and anoikis in colon cancer cells, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **45**, 243–254.
  17. Morozevich, G.E., Kozlova, N.I., Chubukina, A.N., and Berman, A.E. (2003) Role of integrin  $\alpha v \beta 3$  in substrate-dependent apoptosis of human intestinal carcinoma cells, *Biochemistry (Moscow)*, **68**, 416–423.
  18. Морозевич Г.Е., Козлова Н.И., Ушакова Н.А., Преображенская М.Е., Берман А.Е. (2011) Участие интегрин  $\alpha 5 \beta 1$  в механизмах апоптоза и лекарственной резистентности клеток карциномы молочной железы человека, *Биомедицинская химия*, **57**, 77–84.
  19. Jinka, R., Kapoor, R., Pavuluri, S., Raj, A.T., Kumar, M.J., Rao, L., and Pande, G. (2010) Differential gene expression and clonal selection during cellular transformation induced by adhesion deprivation, *BMC Cell Biol.*, **11**, 93. DOI: 10.1186/1471-2121-11-93.
  20. Okayama, H. (2012) Cdc6: a trifunctional AAA+ ATPase that plays a central role in controlling the G(1)-S transition and cell survival, *J. Biochem.*, **152**, 297–303.
  21. Benetatos, L., Vartholomatos, G., and Hatzimichael, E. (2014) Polycomb group proteins and MYC: the cancer connection, *Cell Mol. Life Sci.*, **71**, 257–269.
  22. King, W.G., Mattaliano, M.D., Chan, T.O., Tschlis, P.N., and Brugge, J.S. (1997) Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation, *Mol. Cell Biol.*, **17**, 4406–4418.
  23. Paoli, P., Giannoni, E., and Chiarugi, P. (2013) Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression, *Biochim. Biophys. Acta*, **12**, 3481–3498.
  24. Carduner, L., Picot, C.R., Leroy-Dudal, J., Blay, L., Kellouche, S., and Carreiras, F. (2014) Cell cycle arrest or survival signaling through  $\alpha v$  integrins, activation of PKC and ERK1/2 lead to anoikis resistance of ovarian cancer spheroids, *Exp. Cell Res.*, **320**, 329–342.
  25. Feng, X.X., Liu, M., Yan, W., Zhou, Z.Z., Xia, Y.J., Tu, W., Li, P.Y., and Tian, D.A. (2013)  $\beta 3$  integrin promotes TGF- $\beta 1$ /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HOCl-mediated induction of metastatic phenotype of hepatocellular carcinoma cells by enhancing TGF- $\beta 1$  signaling, *PLoS One*, **8**, e79857.
  26. Watabe, M., Masuda, Y., Nakajo, S., Yoshida, T., Kuroiwa, Y., and Nakaya, K. (1996) The cooperative interaction of two different signaling pathways in response to bufalin induces apoptosis in human leukemia U937 cells, *J. Biol. Chem.*, **271**, 14067–14072.
  27. Cagnol, S., and Chambard, J.-C. (2009) ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death – apoptosis, autophagy and senescence, *FEBS J.*, **277**, 2–21.
  28. Lee, E.-R., Kim, J.-Y., Kang, Y.-J., Ahn, J.Y., Kim, J.-H., Kim, B.-W., Choi, H.-Y., Jeong, M.-Y., and Cho, S.-G. (2006) Interplay between PI3K/Akt and MAPK signaling pathways in DNA-damaging drug-induced apoptosis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1763**, 958–968.
  29. Matsunaga, T., Takemoto, N., Sato, T., Takimoto, R., Tanaka, I., Fujimi, A., Akiyama, T., Kuroda, H., Kawano, Y., Kobune, M., Kato, J., Hirayama, Y., Sakamaki, S., Kohda, K., Miyake, K., and Niitsu, Y. (2003) Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia, *Nature Med.*, **9**, 1158–1165.
  30. Marco, R.A., Diaz-Montero, C.M., Wygant, J.N., Kleinerman, E.S., and McIntyre, B.W. (2003) Alpha 4 integrin increases anoikis of human osteosarcoma cells, *J. Cell Biochem.*, **88**, 1038–1047.
  31. Shen, W., Chen, D., Fu, H., Liu, S., Sun, K., and Sun, X. (2011) S100A4 protects gastric cancer cells from anoikis through regulation of  $\alpha v$  and  $\alpha 5$  integrin, *Cancer Sci.*, **102**, 1014–1018.
  32. Rohrer, N., Welzel, M., Daskalow, K., Pfander, D., Wiedenmann, B., Detjen, K., and Cramer, T. (2008) Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  mediates anoikis resistance via suppression of alpha5 integrin, *Cancer Res.*, **68**, 10113–10120.
  33. Plath, T., Detjen, K., Welzel, M., von Marschall, Z., Murphy, D., Schirner, M., Wiedenmann, B., and Rosewicz, S. (2000) A novel function for the tumor suppressor p16(INK4a): induction of anoikis via upregulation of the alpha(5)beta(1) fibronectin receptor, *J. Cell Biol.*, **150**, 1467–1478.
  34. Damsky, C.H., and Ilic, D. (2002) Integrin signaling: it's where the action is, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **14**, 594–602.
  35. Soung, Y.H., Clifford, J.L., and Chung, J. (2010) Crosstalk between integrin and receptor tyrosine kinase signaling in breast carcinoma progression, *BMB Reports*, **43**, 311–318.
  36. Wang, M., Fu, Z., Wu, J., Zhang, J., Jiang, L., Khazan, B., Telljohann, R., Zhao, M., Krug, A.W., Pikilidou, M., Monticone, R.E., Wersto, R., van Eyk, J., and Lakatta, E.G. (2012) MFG-E8 activates proliferation of vascular smooth muscle cells via integrin signaling, *Aging Cell*, **11**, 500–508.
  37. Blagosklonny, M.V., Schulte, T., Nguyen, P., Trepel, J., and Neckers, L.M. (1996) Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway, *Cancer Res.*, **56**, 1851–1854.
  38. Fehrenbacher, N., Bastholm, L., Kirkegaard-Sorensen, T., Rafn, B., Bottzauw, T., Nielsen, C., Weber, E., Shirasawa, S., Kallunki, T., and Jaattela, M. (2008) Sensitization to the lysosomal cell death pathway by oncogene-induced down-regulation of lysosome-associated membrane proteins 1 and 2, *Cancer Res.*, **68**, 6623–6633.
  39. Liu, J., Mao, W., Ding, B., and Liang, C.S. (2008) ERKs/p53 signal transduction pathway is involved in doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cells and cardiomyocytes, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **295**, H1956–H1965.
  40. Brozovic, A., and Osmak, M. (2007) Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance, *Cancer Lett.*, **251**, 1–16.



**IMPLICATION OF  $\alpha 2\beta 1$  INTEGRIN  
IN ANOIKIS OF MCF-7 HUMAN BREAST  
CARCINOMA CELLS****G. E. Morozevich<sup>1</sup>, N. I. Kozlova<sup>1</sup>, O. Y. Susova<sup>2</sup>,  
P. A. Karalkin<sup>1</sup>, A. E. Berman<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> V. N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry,  
Russian Academy of Medical Sciences, ul. Pogodinskaya 10,  
Moscow 119121, Russia; fax: +7(495)708-3806,  
E-mail: 1938berman@gmail.com

<sup>2</sup> N. N. Blokhin Russian Oncological Center, Russian Academy  
of Medical Sciences, Kashirskoe shosse 24, Moscow 115478,  
Russia; fax: +7(499)324-1205, E-mail: susovaolga@gmail.com

Received May 20, 2014

Silencing of  $\alpha 2\beta 1$  integrin expression significantly increased anchorage-dependent apoptosis (anoikis) and dramatically reduced clonal capacity of MCF-7 human breast carcinoma cells. Depletion of  $\alpha 2\beta 1$  enhanced the production of apoptotic protein p53 and a CDK inhibitor, p27, while down-regulating antiapoptotic protein Bcl-2 and multi-functional protein cMyc. Blocking the expression of  $\alpha 2\beta 1$  did not affect the activity of protein kinase Akt, but it sharply increased the kinase activity of Erk1/2. Pharmacological inhibition of Erk1/2 had a minor effect on anoikis of control cells, while it reduced that of cells with down-regulated  $\alpha 2\beta 1$  to the level of controls. The data show for the first time that integrin  $\alpha 2\beta 1$  is implicated in the protection of tumor cells from anoikis through a mechanism based on the inhibition of protein kinase Erk.

*Key words:* integrins, anoikis, tumor growth, signal protein kinases