

ПРОТИВОБЛАСТОМНЫЕ СРЕДСТВА

β_{III} -ТУБУЛИН — ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ИНВАЗИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

А. С. Портянко¹, С. Т. Акалович², Т. М. Дорошенко²

Инвазивный рост является первым шагом метастатического каскада злокачественных опухолей. Двигательная активность клеток, необходимый компонент инвазии, тесно связана с динамикой структур цитоскелета. Важную роль в обеспечении клеточной подвижности играют микротрубочки, которые состоят из тубулина — гетеродимера, содержащего α и β субъединицы, представленные различными изоформами. Появление в опухоли β_{III} -тубулина играет важную роль в прогнозе течения и химиорезистентности ряда опухолей человека. Данное исследование посвящено определению возможности использования β_{III} -тубулина в качестве молекулы-мишени для подавления инвазивного роста. Установлено, что блокирование экспрессии β_{III} -тубулина в клетках колоректального рака не влияет на их жизнеспособность, однако снижает адгезию к внеклеточному матриксу клеток линии HT-29 на 40 % ($p = 0,0044$), HCT 116 — на 15 % ($p = 0,0436$) и инвазивную активность в 4 раза ($p = 0,0000$ и $p = 0,0001$ соответственно). Данные факты позволяют рассматривать β_{III} -тубулин в качестве молекулы-мишени при разработке противоопухолевых лекарственных препаратов.

Ключевые слова: тубулин; инвазивный рост; метастазирование; колоректальный рак; культура клеток.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка современных лекарственных препаратов основывается на успехах молекулярной биологии и трансляционных медицинских исследований по выявлению ключевых молекул патогенетического каскада и использованию их в качестве мишеней для медикаментозного воздействия. На данный момент в фармацевтической промышленности нашли применение 324 такие молекулы [8]. Большую часть молекул мишеней составляют рецепторы (45 %), ферменты (28 %) и гормоны (11 %) [3]. Расшировка генома человека в 2002 г. позволила выявить от 3000 до 10000 потенциальных фармакологических мишеней [6]. С этих позиций представляется важным установление новых закономерностей изменений молекулярного состава клеток при ряде патологических процессов человека, включая опухолевый рост.

Мало изученной на данный момент времени остается область перестройки цитоскелета при различных состояниях клетки. Одним из компонентов цитоскелета являются микротрубочки — динамические структуры, обеспечивающие внутриклеточный транспорт в

интерфазу, а также образующие веретено деления в фазу митоза. Микротрубочки состоят из тубулина — гетеродимера, содержащего α и β субъединицы, которые могут быть представлены различными изоформами. Для α -субъединицы известно 8 изоформ, а для β — 7 [7]. Также известны многочисленные посттрансляционные модификации как α -, так и β -тубулина, такие как тирозинирование, ацетилирование, полиглутаминирование, детирозинирование, фосфорилирование и др. [10].

Движение клеток, частным вариантом которого является инвазивный рост злокачественных опухолей, тесно связано с динамикой структур цитоскелета. Установлено, что наряду с актиновыми микрофиламентами важную роль в обеспечении клеточной подвижности играют микротрубочки. Более того, функционирование актиновых микрофиламентов зависит от полимеризационной динамики микротрубочек [2].

Ранее нами показано, что в инвазивном фронте колоректального рака повышена экспрессия β_{III} -тубулина [9]. Затем, проведя сравнение с экспрессией β_I -ацетилированного и тирозинированного α -тубулинов, мы установили, что именно β_{III} -тубулин ассоциирован с феноменом опухолевого почкования, который, в свою очередь, представляет собой пул клеток, непосредственно осуществляющих инфильтративный рост [1].

Таким образом, задачей данного исследования явилось установление возможности использования β_{III} -ту-

¹ УО “Белорусский государственный медицинский университет”, 220116, Минск, пр. Дзержинского, 83, тел.: +375 017 3987237.

² ГУ “Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий”, 220053, Минск, Долгиновский тракт, 160, тел.: +375 017 2898619.

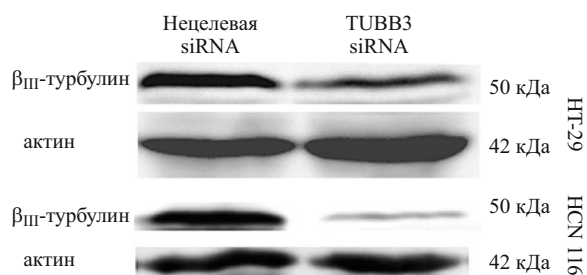


Рис. 1. Экспрессия β_{III} -тубулина и β -актина в лизатах клеток колоректального рака HT-29 и HCT 116 через 72 ч после трансфекции siRNA: siRNA – малая интерферирующая РНК, TUBB3 – ген β_{III} -тубулина

булина в качестве молекулы-мишени для подавления инвазивного роста опухолевых клеток.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования были проведены на клеточных линиях колоректального рака человека (КРР) HT-29 и HCT116, в которых нами ранее была обнаружена экспрессия β_{III} -тубулина.

Трансфекция и РНК-интерференция. РНК-интерференцию в клеточных линиях получали путем трансфекции в клетки малых интерферирующих РНК (siRNA), представляющих собой смесь из 4 последовательностей, специфичных к разным участкам гена β_{III} -тубулина (siGENOME SMARTpool TUBB3, Dharmacon, ThermoScientific, США). В качестве контроля использовали нецелевую siRNA, не имеющую гомологии ни к одному известному гену в последовательности ДНК человека (ON-TARGETplus Non-targeting Pool, Dharmacon, ThermoScientific).

Трансфекцию осуществляли с использованием реагента для трансфекции dharmaFECTsiRNA (Dharmacon, ThermoScientific, США) согласно рекомендациям производителя. Успешность проведения трансфекции контролировали при помощи иммуноблоттинга, для которого использовали моноклональные антитела к β_{III} -тубулину (1:400, Promega, США) и β -актину (1:2000, Sigma), систему визуализации EnVision (DAKO, Дания) и хромоген диаминобензидин (BioGenex, США). Мембраны после окраски анализировали на KodakImageStation 2000R. Денситометрическое измерение результатов вестерн-блоттинга проводили с использованием программного пакета ImageJ 1.47v (NIH, США).

Определение инвазивной активности клеток. Инвазивную активность клеток HT-29 и HCT 116 оценивали в инвазивных камерах производства Costar (Corning, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Мембраны-вкладыши с 8,0 μ m порами покрывались Matrigel (BD Biosciences, США) или бычьим коллагеном I типа (Gibco, США), после чего в верхнюю часть инвазивной камеры вносили трипсионизированные отмытые клетки в равной концентрации, в нижнюю часть камеры — полную ростовую среду и инкубировали в течение 24 ч при 37 °C в эксикаторе во влажной газовой среде, содержащей 5 % CO_2 . После инкубации мембраны 15 мин фиксировали в 4 % растворе формальдегида и окрашивали кристаллическим фиолетовым (Sigma-Aldrich, США). Неинвазивировавшие клетки, находившиеся на верхней поверхности мембраны, удаляли. Подсчет инвазивировавших клеток на нижней поверхности мембраны производили в 5 независимых полях зрения светового микроскопа ($\times 200$).

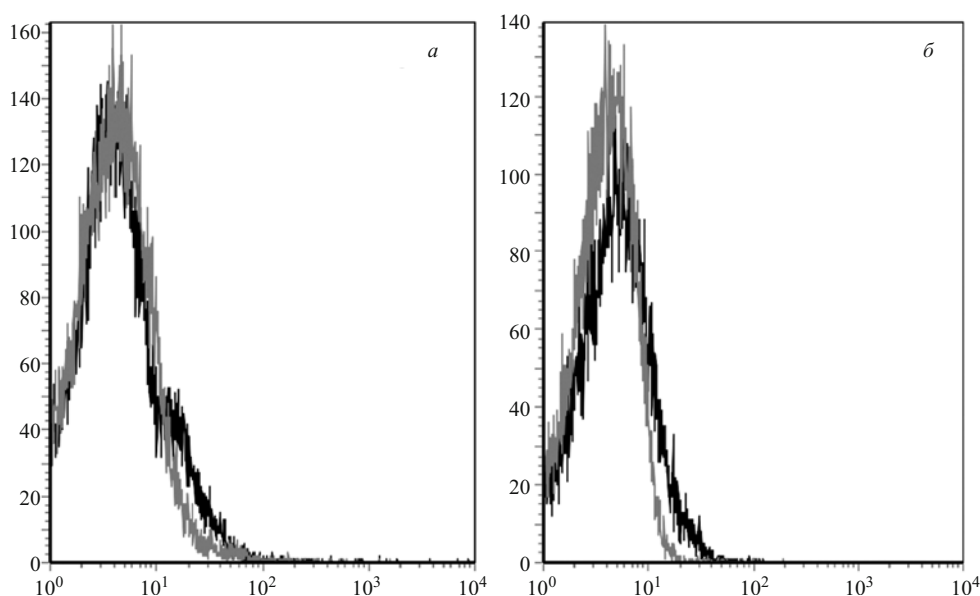


Рис. 2. Распределение клеток, окрашенных аннексином V, после трансфекции siRNA. Данные проточной цитофлуориметрии: а — HT-29, б — HCT 116; серый график — нецелевая siRNA, черный — TUBB3 siRNA. По оси абсцисс — интенсивность флуоресценции, оси ординат — количество клеток.

Оценка адгезивных свойств клеток. Клетки рассевали в лунки 24-луночного культурального планшета (Costar, США), предварительно покрытые коллагеном I типа (Gibco, США). После 2 ч культивирования при + 37 °С среду с неадгезированными клетками удаляли. Подсчет неадгезированных клеток проводили с трипановым синим (Sigma-Aldrich, США). Уровень адгезии (УА) в процентах вычисляли по формуле:

$$\text{УА} = 100 \% - \left\{ \frac{\text{число клеток в супернатанте (неадгезировавших)}}{\text{число клеток, посаженных в лунку}} \right\} \cdot 100 \%$$

Оценка апоптотических и некротических процессов. Окраску клеток проводили с использованием набора ANNEXIN V-FITC/7-AAD KIT (Beckman Coulter, США), следуя инструкции производителя. Результаты учитывали на проточном цитофлуориметре Becton Dickinson FACScan.

Статистическую обработку проводили с использованием Microsoft Office Excel 365 (лицензионная копия), результаты представлены в виде (среднее \pm стандартное отклонение). Для анализа данных применяли ANOVA тест. Нулевая гипотеза отклонялась при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате трансфекции экспрессия β_{III} -тубулина была подавлена в среднем в $(3,1 \pm 0,9)$ раза в клетках линии HT-29 и в $(4,2 \pm 1,8)$ раза — в НСТ 116 ($p = 0,0299$ и $p = 0,0027$, соответственно по данным 3 независимых экспериментов) (рис. 1).

При этом количество инвазивировавших в мембрану клеток уменьшилось в среднем (по данным 3 независимых экспериментов) с $(36,3 \pm 23,3)$ до $(9,9 \pm 4,4)$ клеток в поле зрения для HT-29 ($p = 0,0000$) и с $(10,9 \pm 10,0)$ до $(2,7 \pm 3,2)$ для НСТ 116 ($p = 0,0001$). Такое снижение может быть связано с несколькими факторами: замедлением двигательной активности, гибелью клеток, а также уменьшенной адгезией клеток к белкам внеклеточного матрикса. Для изучения возможных вариантов была исследована адгезивность изучаемых клеточных линий с “выключенной” экспрессией β_{III} -тубулина, а также влияние трансфекции TUBB3 siRNA на апоптотические и некротические процессы. Уровень адгезии снизился с $(82,2 \pm 4,2) \%$ до $(67,2 \pm 7,9) \%$ ($p = 0,0436$) для НСТ 116 и с $(73,9 \pm 2,5) \%$ до $(36,1 \pm 11,1) \%$ ($p = 0,0044$).

Исследование процессов гибели клеток при помощи двойного мечения аннексином V и 7-аминоактиномицином Д (7-ААД) позволяет определить как апоптотические, так и некротические клетки в культуре. Живые клетки не окрашиваются ни аннексином V, ни 7-ААД, клетки в ранней фазе апоптоза или некроза маркируются аннексином V (+) или 7-ААД, соответственно, для мертвых клеток характерна двойная пози-

тивность (аннексин V (+) и 7-ААД (+)) независимо от механизма их гибели. На рис. 2 представлены данные соответствующих измерений для аннексина V. Результаты оценки окрашивания 7-ААД имели аналогичный характер. Из представленных на рис. 2 данных видно, что кривая распределения клеток, меченных аннексином V, в клетках с подавленной экспрессией β_{III} -тубулина не отличается от таковой в контрольной культуре.

В организме человека экспрессия β_{III} -тубулина ограничена нервной тканью и клетками Сертоли яичка. В других органах и тканях появление этого изоформа цитоскелетного белка описано при злокачественном росте. В частности, на данный момент известна роль β_{III} -тубулина в прогнозе течения и химиорезистентности ряда опухолей, таких как рак легкого, яичника, молочной железы, желудка и поджелудочной железы [5]. В неизмененных эпителиальных клетках толстой кишки β_{III} -тубулин не встречается. В клетках рака толстой кишки экспрессия данной молекулы сконцентрирована в инвазивном фронте опухоли [9], что может говорить либо о значении β_{III} -тубулина непосредственно для инвазивного роста опухоли, либо о его протекторной роли и значимости для выживания пула инвазивных клеток. В пользу последнего предположения говорит высокая устойчивость данного типа тубулина к свободно-радикальному стрессу [7].

Из полученных нами данных можно заключить, что “выключение” гена β_{III} -тубулина не является критическим для жизнедеятельности клетки и не стимулирует ни апоптоз, ни некроз клеток, что согласуется с результатами исследований (2010), в которых была продемонстрирована витальная значимость β_I -тубулина, в то время как β_{III} -изотип не влиял на жизнеспособность клеток [4]. Однако это не противоречит утверждению о роли β_{III} -тубулина в выживании клеток в неблагоприятных условиях.

Представленные результаты также свидетельствуют о важной роли β_{III} -тубулина в инвазивной активности клеток КРР, более того, можно утверждать, что реализация этого влияния полностью или частично опосредована через воздействие на систему адгезии клеток к молекулам внеклеточного матрикса.

Так или иначе, β_{III} -тубулин представляется перспективной молекулой, через блокаду которой как на уровне экспрессии гена, так и на уровне конечного белка можно достигнуть снижения инвазивной активности эпителиальных злокачественных опухолей.

Вопрос о низкомолекулярном веществе, способном избирательно блокировать β_{III} -тубулин, до сих пор остается открытым. Большинство используемых на данный момент веществ, влияющих на полимеризацию микротрубочек, в частности таксаны и алкалоиды барвинка, не взаимодействуют с этим изотипом. Перспективной представляется группа эпотилонов, способных обойти резистентность, обусловленную β_{III} -тубулином, однако их эффект не носит избирательного харак-

тера и связан, в первую очередь, с антимитотическим действием.

В нашем исследовании такая блокада достигалась введением малых интерферирующих РНК, которые на современном этапе уже начинают использоваться в качестве фармакологических препаратов. Снижение экспрессии β_{III} -тубулина также можно получить при помощи двухцепочечной РНК (dsRNA), микроРНК (miRNA), а также коротких РНК, образующих шпильки (shRNA). В качестве примеров последовательностей siRNA, успешно блокирующих РНК β_{III} -тубулина, могут быть следующие (5' → 3'):

```
GCGGCAACUACGUGGGCGA
AGGAGUAUCCCGACCGCAU
CAAGGUGCGUGAGGAGUAU
CCACCUAGGCCACGUGUGA
GACAUCUCUUCAGGCCUGACAAUUU
GCAUCAUGAACACCUUCAGCGUCGU
CAGCUGGAGCGGAUCAGCGUCUACU
```

Одновременно можно использовать как одну последовательность, так и несколько. Чем больше последовательностей используется одновременно, тем выше надежность блокирования.

К “выключению” β_{III} -тубулина приведет и применение антисмысловой полинуклеотидной последовательности к РНК-транскрипту. Кроме того, в качестве агентов, способных снизить экспрессию β_{III} -тубулина, могут рассматриваться ДНКзим или рибозим — ферменты, способные специфически разрезать ДНК-последовательность или РНК-транскрипт, соответственно.

ВЫВОДЫ

Блокада экспрессии β_{III} -тубулина в клетках колоректального рака не влияет на жизнеспособность клеток,

однако снижает адгезию к внеклеточному матриксу клеток линии HT-29 на 40 % ($p = 0,0044$), HCT 116 — на 15 % ($p = 0,0436$) и инвазивную активность в 4,1 ($p = 0,0000$) и в 4 ($p = 0,0001$) раза соответственно. Данные факты позволяют рассматривать β_{III} -тубулин в качестве молекулы-мишени при разработке противоопухолевых лекарственных препаратов.

Авторы выражают благодарность Арне Остману (Каролинский институт, Швеция) за предоставление части культур клеток и реактивов.

Исследование выполнено при поддержке Международного научно-технического центра (№ В-1636), а также Государственной программы научных исследований Республики Беларусь (№ 1.2.42).

ЛИТЕРАТУРА

1. А. С. Портянко, М. Ю. Дегтярева, Ю. В. Горгун и др., *Лечеб. дело*, № 4, 64 – 69 (2012).
2. T. K. Akhshi, D. Wernike, A. Piekny, *Cytoskeleton*, **71**(1), 1 – 23 (2014).
3. J. Drews, *Science*, **287**(5460), 1960 – 1964 (2000).
4. J. Guo, C. Walss-Bass, R. F. Ludueña, *Cytoskeleton*, **67**(7), 431 – 441 (2010).
5. M. Kavallaris, *Nat. Rev. Cancer*, **10**(3), 194 – 204 (2010).
6. Y. Landry, J. P. Fundam, *Clin. Pharmacol.*, **22**(1), 1 – 18 (2008).
7. R. F. Ludueña, A. Banerjee, T. Fojo (eds.), *Cancer Drug Discovery and Development: The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology*, Humana Press, Totowa (2008), pp. 123 – 177.
8. J. P. Overington, B. Al-Lazikani, A. L. Hopkins, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**(12), 993 – 996 (2006).
9. A. Portyanko, P. Kovalev, J. Gorgun, et al., *Virchows Arch.*, **454**(5), 541 – 548 (2009).
10. D. Wloga, J. Gaertig, *J. Cell Sci.*, **123**(20), 3447 – 3455 (2010).

Поступила 17.03.15

BETA-III TUBULIN AS A POTENTIAL TARGET FOR BLOCKING INVASIVE GROWTH OF MALIGNANT EPITHELIAL TUMORS

A. S. Portyanko¹, S. T. Akalovich², and T. M. Doroshenko²

¹ Department of Pathology, Belarusian State Medical University, ul. Dzerzhinskogo 83, Minsk, 220116, Belarus Republic

² Laboratory for Antibodies and Cytokines Biotechnology, Republic Research & Production Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies, Dolginovskii Trakt 160, Minsk, 220053 Belarus Republic

Invasive growth is the first step of metastatic cascade in the growth of malignant tumors. The mobility of cells, which is a necessary factor of the invasive growth of malignant tumors, is closely linked to the dynamic structure of cytoskeleton. An important role in cell motility is played by microtubules and actin microfilaments. Microtubules consist of tubulin – a heterodimer comprising α and β subunits, which can be represented by different isotypes. The appearance of beta-III tubulin in a tumor is essential for chemoresistance and prognosis of some tumors in humans. This study focuses on determining the possibility of using beta-III tubulin as a target molecule for the suppression of invasive growth. It is established that blocking of the beta-III tubulin expression in colorectal cancer cells does not affect their viability, but reduces the cell adhesion to the extracellular matrix by 40% for HT-29 ($p = 0.0044$) and by 15% ($p = 0.0436$) for HCT 116) and produces a four-fold decrease in the invasive activity ($p = 0.0000$ and 0.0001 , respectively). These facts allow considering beta-III tubulin as a target molecule in the development of antitumor drugs.

Keywords: beta-III tubulin; malignant tumors; invasive growth; metastasis; colorectal cancer; cell culture.