

УДК 576.524+577.22

ТЕТРАМЕРНЫЙ RGD ВЫЗЫВАЕТ КЛАСТЕРИЗАЦИЮ РЕЦЕПТОРОВ ИНТЕГРИНА $\alpha v \beta 3$ НА ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА И СНИЖАЕТ ИХ ВЫЖИВАЕМОСТЬ

М.А. Рубцов^{1,2,6}, А.А. Маслакова^{1,2,3}, Д.М. Поташникова⁴, В.П. Вейко⁵,
М.С. Сыркина^{1,2,5*}

(¹кафедра молекулярной биологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; ²Международная Ассоциированная Лаборатория LIA 1066 «Laboratoire franco-russe de recherches en oncologie» биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; ³кафедра физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; ⁴кафедра клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; ⁵ФИЦ Биотехнологии РАН; ⁶Отдел управления инновационной деятельностью, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова; e-mail: krimy@yandex.ru)

Получен рекомбинантный гибридный белок SR15, состоящий из стрептавидина, слитого на С-конце с меланома-адресующим RGD-пептидом. Продемонстрирована способность данного белка к узнаванию клеток меланомы человека (линия MeWo). Определены типы экспрессирующихся RGD-связывающих интегриновых рецепторов в клетках данной линии. Установлено, что рекомбинантный гибридный белок SR15 связывается с интегрином $\alpha v \beta 3$ на поверхности клеток меланомы. Связывание с белком SR15 приводит к кластеризации рецепторов $\alpha v \beta 3$ на поверхности клеток меланомы (MeWo), интернализации рекомбинантного белка и практически двукратному снижению выживаемости таких клеток.

Ключевые слова: RGD, стрептавидин, меланома человека, MeWo, интегрин, $\alpha v \beta 3$ рецептор, кластеризация рецептора.

Метастазирование напрямую зависит от взаимодействия опухолевых клеток с белками внеклеточного матрикса, тромбоцитами, клетками эндотелия, различными орган-специфическими факторами. Одной из немаловажных характеристик метастазирования является способность опухолевых клеток к прикреплению, миграции и инвазии через тканевой барьер. При инвазии происходит вовлечение механизмов клеточной адгезии, в которых принимают участие молекулы интегринов [1].

Функции интегринов разнообразны: они участвуют в клеточной адгезии, выступают в роли трансмембранных якорей для молекул цитоскелета, активируют множество внутриклеточных сигнальных путей, приводящих к модификации поведения клетки (пролиферация, выживаемость, подвижность, изменение формы, полярности и дифференцировки), а также экспрессии ряда генов. К настоящему времени установлено, что в норме интегрины принимают участие в блокировании апоптоза (через PI3-киназу и Akt) и стимуляции прогрессии клеточного цикла (через ERK и циклин D1) [2].

Некоторые интегриновые рецепторы способны к узнаванию трипептида RGD в белках внеклеточ-

ного матрикса [3]. Было выявлено, что в клетках рака различного происхождения (меланома, глиобластома, рак шейки матки, рак молочной, предстательной, поджелудочной железы, яичников, кишечника, немелкоклеточный рак легкого), а также в клетках эндотелия опухолевых сосудов наблюдается повышенная экспрессия RGD-узнающих интегриновых рецепторов [4–12]. В ряде случаев установлена прямая корреляция между гиперэкспрессией интегрина $\alpha v \beta 3$ в клетке и наличием у такой клетки высокого метастатического потенциала [9, 13, 14]. С учетом вышеупомянутой избирательности экспрессии интегрина $\alpha v \beta 3$ данная молекула может рассматриваться как онкомаркер. В настоящее время разрабатывается целый ряд противоопухолевых препаратов, действие которых основано на взаимодействии с данным рецептором, а в качестве адресующей группы используется RGD-пептид или имитирующая его молекула [15]. Однако ассоциация интегрина $\alpha v \beta 3$ с RGD-пептидами не всегда приводит к желаемому результату – уничтожению раковых клеток [16]. Более того, в ряде случаев следствием такого воздействия является увеличение пролиферации клеток опухоли [17]. В связи с вышесказанным

возникла необходимость дополнительного исследования функций интегриновых рецепторов – выявления их роли в процессах жизнедеятельности эукариотических клеток в норме, а также участия этих рецепторов в метастазировании злокачественных новообразований.

Цель данной работы – исследование влияния гибридного рекомбинантного белка, содержащего тетрамерный RGD, на жизнеспособность клеток метастатической меланомы.

Материалы и методы

Материалы, культуры клеток, штаммы бактерий

В работе использовали соли производства компании «Merck» (Германия), а также отечественного производства («ос.ч.»); компоненты для получения микробиологических сред («Difco», США); агарозу, акриламид, N, N'-метиленабисакриламид, 2-иминобиотинагарозу, ДМСО («Sigma-Aldrich», США), Кумасси R-250 («Serva», Германия), мембраны и ячейки для ультрафильтрации («Amicon», США), ферменты и наборы для проведения PCR, экстракции фрагментов ДНК из агарозного геля и выделения плазмидной ДНК, а также ДНК-маркеры и белковые маркеры («Fermentas», Литва), FITC-биотин («Invitrogen», США), моноклональные антитела к различным цепям интегриновых рецепторов («Abcam», США), ПФА («Sigma-Aldrich», США), набор для определения пролиферативной активности клеток на основе ХТТ («Biological Industries», Израиль).

Для культивирования клеточных линий использовали модифицированную Дульбекко среду Игла (DMEM), раствор Версена, раствор трипсина («Панэко», Россия), фетальную сыворотку теленка («Hyclone», США), антибиотики пенициллин и стрептомицин («Sigma-Aldrich», США). Бактериальные штаммы получены из музея ФГУП ГосНИИ Генетика. Культура клеток меланомы человека (линия MeWo) была любез-

но предоставлена лабораторией радиоизотопных методов исследования НИИ ЭДиТО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Выделение фракции мембранных белков из клеток линии MeWo

10 млн клеток, осажденных центрифугированием (3 мин, 1600 об/мин), ресуспендировали в 600 мкл лизирующего буфера (PBS, 100 мМ *n*-додецил- β -D-мальтозид, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ ФМСФ) и инкубировали при перемешивании при +4°C в течение 1 ч. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием (30 мин при 20 000 об/мин).

Иммуноблоттинг

Мембранные белки, полученные из клеток линии MeWo, разделяли с помощью электрофореза в 10%-м ПААГ в денатурирующих условиях по Лэммли. Разделенные белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Для идентификации цепей интегриновых рецепторов использовали, в соответствии с рекомендациями изготовителя, специфические моноклональные антитела («Abcam», США) и вторичные антитела ослы (DARI) или овцы (SAMI), конъюгированные с пероксидазой хрена («Abcam», США). Названия антител, их разведения, а также количество лизата, использовавшееся для анализа, приведены в табл. 1. Идентификацию иммунных комплексов осуществляли с помощью набора «Clarity™ Western ECL Blotting Substrate» («Bio-Rad», США)

Получение химерного белка SR15

Получение конструкции pSR15 осуществляли аналогично получению конструкций pSdR [18] на базе вектора pUC18. Ген белка SR15 содержал фрагмент, кодирующий стрептавидин, слитый с фрагментом, кодирующим RGD-содержащий пептид (последовательность пептида SRAGAGFPGRGDCSQE). Полученным

Антитела, использовавшиеся для иммуноблоттинга

Антитело I	Мишень	Количество лизата (эквивалентное число тыс. клеток)	Разведение антитела I	Антитело II	Разведение антитела II
EPR2417Y	интегрин β 3	10 мкл (10)	1:500	DARI	1:10000
ab116570	интегрин β 5	20 мкл (20)	1:100	DARI	1:10000
ab55364	интегрин β 8	20 мкл (20)	1:200	SAMI	1:8000
EPR7854	интегрин α 5	10 мкл (10)	1:1000	DARI	1:10000
EPR5583	интегрин α v β 6	10 мкл (10)	1:1000	DARI	1:10000

вектором трансформировали клетки штамма *E. coli* MG1655. Нарботку и хроматографическую очистку слитого белка SR15 получали по методике, описанной в [19]. Очищенный белок лиофилизировали и хранили при -70°C . Концентрацию белка в растворе определяли спектрофотометрически при 280 нм, принимая коэффициент молярной экстинкции для стрептавидина равным 3,2 [20].

Мечение белка SR15 флуоресцеином

К раствору белка SR15 в 1 мМ Tris-HCl-буфере (pH 8,0) добавляли FITC, конъюгированный с биотином (FITC-биотин), растворенный в ДМСО, и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте, используя молярное соотношение белок:FITC-биотин, равное 1:4.

Подготовка препаратов для флуоресцентной микроскопии

Клетки линии MeWo высевали на стекла или чашки со стеклом и растили в течение 24–48 ч до достижения 60–70% конфлюентности монослоя. Белок SR15 растворяли в PBS, фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и метили флуоресцеином по описанной выше методике. Среду удаляли, клетки промывали три раза однократным ДФСБ и 1 раз версеном. Затем в лунки вносили по 1 мл DMEM без сыворотки, содержащей 100 мкг/мл SR15, связанного с FITC-биотином (в пересчете на исходный SR15). Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C , во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 (или при $+4^{\circ}\text{C}$). Для удаления несвязавшихся белков клетки промывали 3 раза однократным ДФСБ, после чего вносили в лунки по 3 мл DMEM без сыворотки. Полученные препараты незамедлительно анализировали, используя флуоресцентный микроскоп.

Иммуоокрашивание

После взаимодействия с FITC-меченым белком и удаления несвязавшегося белка клетки фиксировали на покровных стеклах 2%-м раствором параформальдегида в течение 10 мин при комнатной температуре. Иммуоокрашивание проводили с помощью первичных моноклональных антител мыши к интегину $\alpha\text{v}\beta 3$ (VNR-1) («Abcam», США) в разведении 1:500 и вторичных антител козы, конъюгированных с красителем Alexa-647, следуя рекомендациям производителя. После проведения иммуоокрашивания покровные стекла с препаратами клеток фиксировали на предметных стеклах в заключающей среде «DAKO Fluorescence

Mounting Medium» («Agilent Technologies», Германия) и хранили в темноте при $+4^{\circ}\text{C}$.

Флуоресцентная микроскопия и исследование колокализации

Живые клетки и фиксированные препараты анализировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа на базе «Nikon Eclipse» («Nikon», Япония). Полученные изображения изучали с помощью открытого сервиса для обработки и анализа изображений ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>), применяя плагины «Colocalization Test» и «Colocalization Threshold», позволяющие оценить достоверность, статистическую значимость (метод рандомизации Костес, коэффициент корреляции Пирсона $p > 95\%$) и степень колокализации флуоресцентных сигналов (коэффициенты колокализации Мандерса). Для каждой из областей (кластер целиком, центральная часть кластера и область между кластерами) был проведен анализ не менее 10 изображений.

Проточная цитофлуориметрия

Клетки линии MeWo высевали на культуральные чашки диаметром 9 см («Greiner», Австрия) и растили в течение 13–15 ч до достижения 30% конфлюентности монослоя.

Белок SR15 растворяли в ФСБ, фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и метили флуоресцеином по описанной выше методике.

Клетки промывали с помощью ДФСБ и инкубировали в течение 5–10 мин с версеном. Версен удаляли и «снимали» клетки со дна чашки с помощью DMEM без сыворотки. Для подсчета клеток использовали камеру Горяева. Разведение проводили с помощью DMEM без сыворотки таким образом, чтобы в 1 мл суспензии содержалось 240 тыс. клеток. Суспензию делили на аликвоты по 250 мкл и добавляли к каждой аликвоте 25 мкл раствора белка SR15 в концентрации 1 мг/мл. Клетки инкубировали в течение 1 ч при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO_2 или при $+4^{\circ}\text{C}$, периодически встряхивая. Для удаления несвязавшихся белков клетки промывали 3 раза однократным ДФСБ, после чего ресуспендировали в однократном ДФСБ и анализировали с помощью проточного цитофлуориметра «BD FACS AriaIII» (США).

Определение жизнеспособности клеток

Клетки MeWo снимали 0,25%-м раствором трипсина/ЭДТА и готовили суспензию с концентрацией клеток 8000 кл/100 мкл среды. Суспензию вносил в лунки 96-луночного культурального планшета (по 100 мкл суспензии в

лунку) и инкубировали 24 ч при +37°C во влажной атмосфере в присутствии 5% CO₂. Среду заменяли на бессывороточную (DMEM, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 1× раствор заменимых аминокислот, 1 мМ пируват натрия, 300 мкг/мл БСА (не содержащего жирных кислот), 5 мкг/мл бычьего трансферрина, и инкубировали в течение ночи. В лунки вносили либо раствор моноклонального антитела мыши к интегрину $\alpha\beta 3$ (VNR-1) в разведении 1:1000, либо 1,5 мкМ раствор SR15, либо 6 мкМ раствор пептида GRGDS и инкубировали в течение 24 ч (контроль – клетки в бессывороточной среде). Выживаемость клеток детектировали с помощью коммерческого набора на основе реактива ХТТ по протоколу производителя. Оптическую плотность раствора хромогена в культуральном супернатанте определяли с помощью планшетного спектрофотометра «Zenyth 3100» («Anthos Labtec Instruments GmbH», Австрия). Результаты представлены в графическом виде: зависимость выживаемости клеток (в экспериментальных точках) в % относительно контроля 100%-й выживаемости от выживаемости \pm стандартная ошибка среднего).

Результаты и обсуждения

Характеристика интегринового состава в клетках модельной линии (MeWo)

На поверхности опухолевых клеток могут одновременно присутствовать несколько типов RGD-связывающих интегринов [5, 21–23]. Более того, в ходе изменения метастатического потенциала клеток состав интегриновых рецепторов может изменяться [24]. Было показано, что уровни экспрессии отдельных субъединиц интегриновых рецепторов отличаются в субпопуляциях клеток одной и той же линии, обладающих разным метастатическим потенциалом [25]. В связи с этим представлялось важным определить типы RGD-связывающих интегриновых рецепторов, присутствующие в клетках линии меланомы человека (MeWo), выбранной нами в качестве модели метастатического рака.

При выборе метода определения состава RGD-связывающих интегриновых рецепторов мы учитывали необходимость идентификации белкового продукта на поверхности клеток. В данной работе анализировали содержание разных типов RGD-связывающих интегринов во фракции мембранных белков с помощью метода иммуноблоттинга. Нами были использованы специфические антитела, подобранные таким образом, чтобы оценить наличие в клетках прак-

тически всех RGD-связывающих рецепторов (рис. 1, А). В результате проведенных экспериментов было установлено, что в клетках линии MeWo присутствуют интегрины $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha\beta 8$, $\alpha\beta 6$, (рис. 1, Б).

Связывание белка SR15 с клетками MeWo приводит к его интернализации

Ранее было показано, что сконструированные нами белки SdR10, SdR13 и SdR15 обладают способностью к селективному узнаванию клеток меланомных линий человека (MeWo) и мыши (B16F10) благодаря наличию в их составе RGD-содержащего пептида [18]. Белок SR15, отличающийся от белка SdR15 только последовательностью линкера, располагающегося между молекулой стрептавидина и RGD-содержащим пептидом, обладал аналогичными свойствами [26]. Исследование флуоресценции популяций клеток, инкубированных с FITC-меченым белком SR15, с помощью проточного цитофлуориметра показало наличие сдвига интенсивности флуоресценции по сравнению с клетками, инкубированными в отсутствие белка (рис. 2). Увеличение сдвига интенсивности флуоресценции у клеток, инкубированных с рекомбинантным белком при +37°C по сравнению с клетками, инкубированными с белком при +4°C, указывает на наличие интернализации FITC-меченого белка SR15. Этот вывод подтверждают и данные конфокальной флуоресцентной микроскопии: у клеток, инкубированных с FITC-меченым белком SR15 при +4°C, свечение FITC наблюдается только на периферии (рис. 2, А1, Б1, В1), в то время как при инкубировании клеток с FITC-меченым белком при +37°C свечение выявляется как по периферии, так и внутри клеток (рис. 2, А2, Б2, В2).

Для опухолевых клеток описан механизм перемоделирования внеклеточного матрикса, активирующийся при инвазии. Расположенные на поверхности таких клеток матриксные металлопротеазы расщепляют протяженные белковые структуры. Фрагменты матрикса, связанные с интегриновыми рецепторами, могут поглощаться клеткой, в лизосомах которой происходит их окончательная деградация. В частности, было продемонстрировано, что астроциты, претерпевшие злокачественную трансформацию, способны интернализировать и деградировать измененный витронектин [27]. Факт наличия интегрин-опосредованной интернализации неоднократно отмечался исследователями, изучающими взаимодействие искусственно созданных RGD-содержащих молекул с опухолевыми клетками человека и животных. Так, в литературе

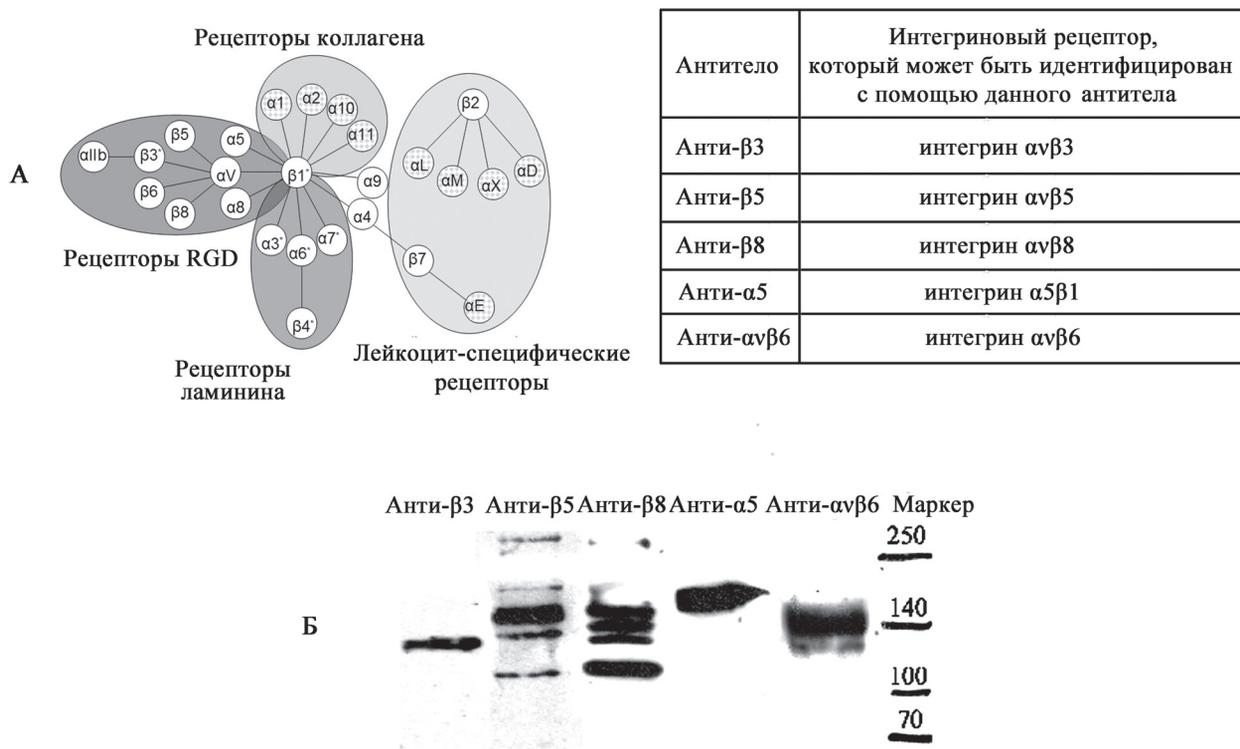


Рис. 1. Типы RGD-связывающих интегриновых рецепторов и антитела для идентификации соответствующих α- и β-цепей (А). RGD-связывающие интегрины, обнаруженные в клетках линии MeWo с помощью данных антител методом иммуноблоттинга (Б)

описана интернализация синтетической молекулы, содержащей тетрамерный RGD (RAFT-RGD) [28], циклического пептида, содержащего RGD-мотив [29], а также конъюгата иммуноглобулин-циклоRGD [30].

Белок SR15 содержит RGD-мотивы, наличие которых характерно для белков внеклеточного матрикса [31–34]. Таким образом, ассоциация SR15 с интегриновыми рецепторами на поверхности клеток меланомы может активировать те же сигнальные пути, которые активируются в опухолевых клетках во время перемоделирования внеклеточного матрикса. Следствием этого может являться наблюдаемая нами интернализация FITC-меченого SR15.

Кластеризация рецепторов αβ3 на поверхности клеток MeWo

При инкубации клеток MeWo с белком SR15 на поверхности клеток происходит формирование кластеров, состоящих из интегриновых рецепторов αβ3 (рис. 3, Б). В то же время в клетках, не инкубированных с белком, формирования кластеров не происходит (рис. 3, А).

Для подтверждения того, что в кластеризации участвуют рецепторы, активированные в результате связывания с белком SR15, был про-

веден анализ колокализации флуоресценции FITC-меченого белка (рис. 4, А), связавшегося с клеточными рецепторами, и антител к интегрину αβ3, конъюгированных с Alexa-647 (рис. 4, Б). На рис. 4, В представлено наложение изображений, полученных при детекции сигналов в соответствующих каналах, при этом области колокализации сигналов, соответствующих FITC и Alexa-647, выделены белым цветом. Видно, что максимальная степень колокализации сигналов наблюдается именно в кластерах, при этом в центре кластеров сигналы FITC и Alexa-647 колокализируются практически полностью (около 94%). Результаты статистического анализа указывают на то, что в области кластеров свыше 75% белка SR15 ассоциировано с интегрином αβ3 и свыше 50% рецептора αβ3 ассоциировано с белком SR15. В центральной части кластеров эти значения еще выше (более 94% рецепторов αβ3 связаны с белком SR15, и свыше 94% белка SR15 связано с интегрином αβ3). В областях, располагающихся между кластерами, наличие истинной колокализации рецепторов и белка статистически не подтверждается (рис. 4, В1). Таким образом, можно утверждать, что рецепторы αβ3, связанные с белком SR15, оказываются «стянутыми» в кластеры.

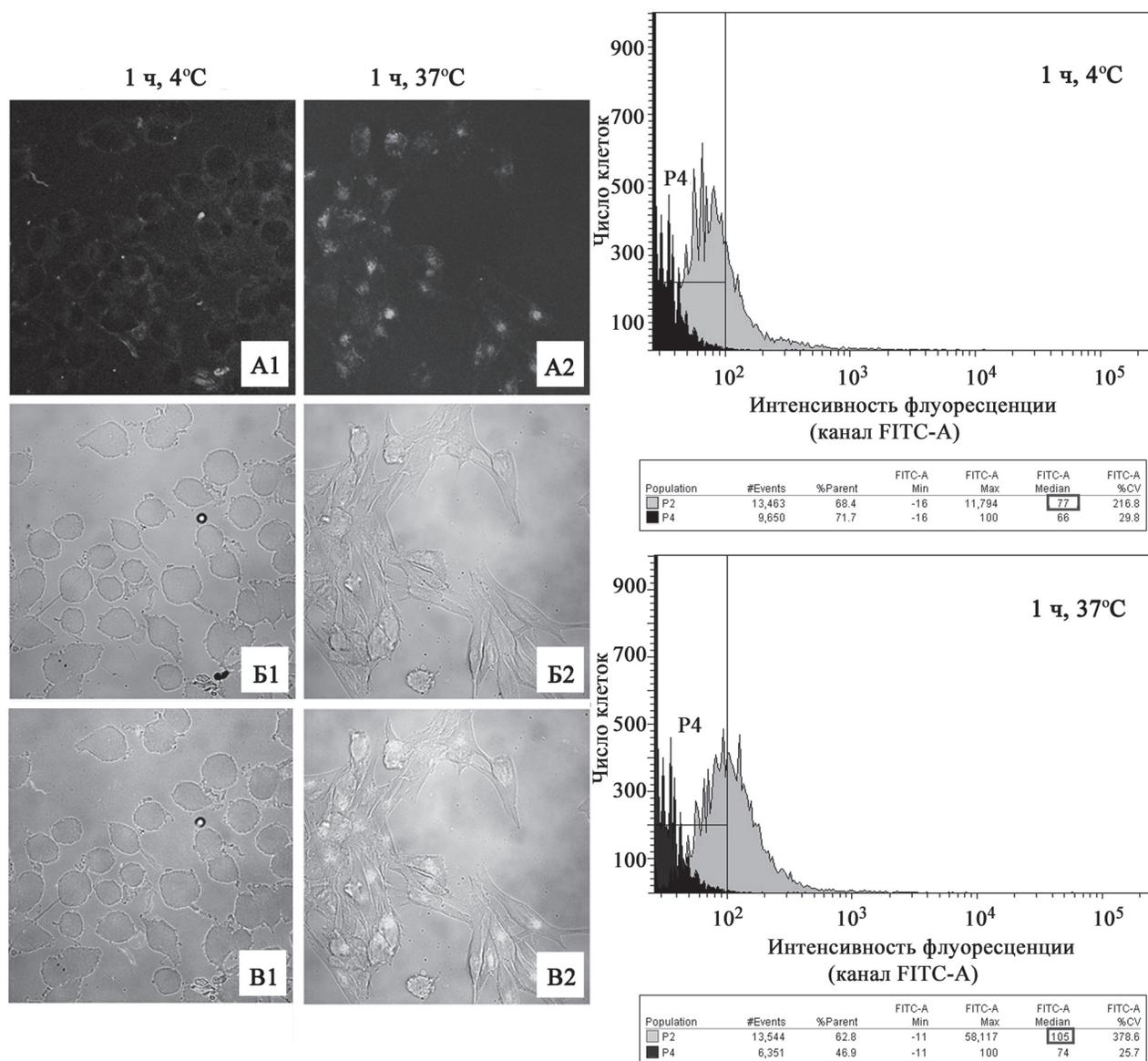


Рис. 2. Флуоресценция клеток линии MeWo в результате инкубации с 1,5 мкМ раствором белка SR15 в течение 1 ч при +4°C (мембранная локализация флуоресценции FITC) и при +37°C (мембранная и внутриклеточная локализация флуоресценции FITC). А – флуоресценция FITC, Б – фотографии в проходящем свете, В – объединенное изображение. Справа приведены графики распределения интенсивности флуоресценции в клеточных популяциях, подвергавшихся инкубации с раствором FITC-меченого белка SR15 в разных температурных условиях (серый) и не подвергавшихся инкубации с каким-либо белком (черный)

Наличие в кластерах рецепторов $\alpha\upsilon\beta 3$, не колокализованных с белком SR15, может объясняться простой диссоциацией белка по прошествии некоторого времени после первичного связывания с рецептором и его активацией. Вследствие этого активированный рецептор может участвовать в формировании кластера уже не будучи связанным с белком.

С другой стороны, присутствие в кластерах белков, не колокализованных с интегрином $\alpha\upsilon\beta 3$, может также указывать на участие в формировании кластеров других RGD-связывающих инте-

гриновых рецепторов. Действительно, в ряде работ упоминается о взаимном влиянии интегринов $\alpha\upsilon\beta 3$ и $\alpha 5\beta 1$ при связывании природных лигандов [27, 35].

Механизм кластеризации изучен достаточно подробно. В частности, показано, что одновременная ассоциация двух и более молекул рецепторов с близко расположенными лигандами приводит к образованию кластеров [36]. Вследствие кластеризации интегриновых рецепторов, индуцированной взаимодействием с RGD-мотивами молекул внеклеточного матрикса, происходит формирова-

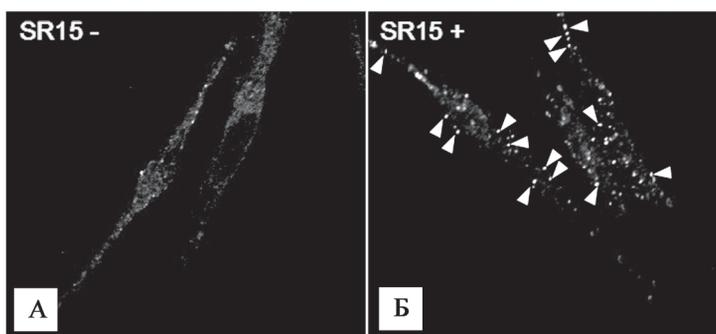


Рис. 3. Кластеризация рецепторов $\alpha\beta 3$ на поверхности клеток линии MeWo под влиянием белка SR15. А – флуоресценция Alexa647 в клетках в отсутствие белка SR15, Б – флуоресценция Alexa647 в клетках, инкубированных с SR15 в течение 1 ч. Кластеры отмечены стрелками

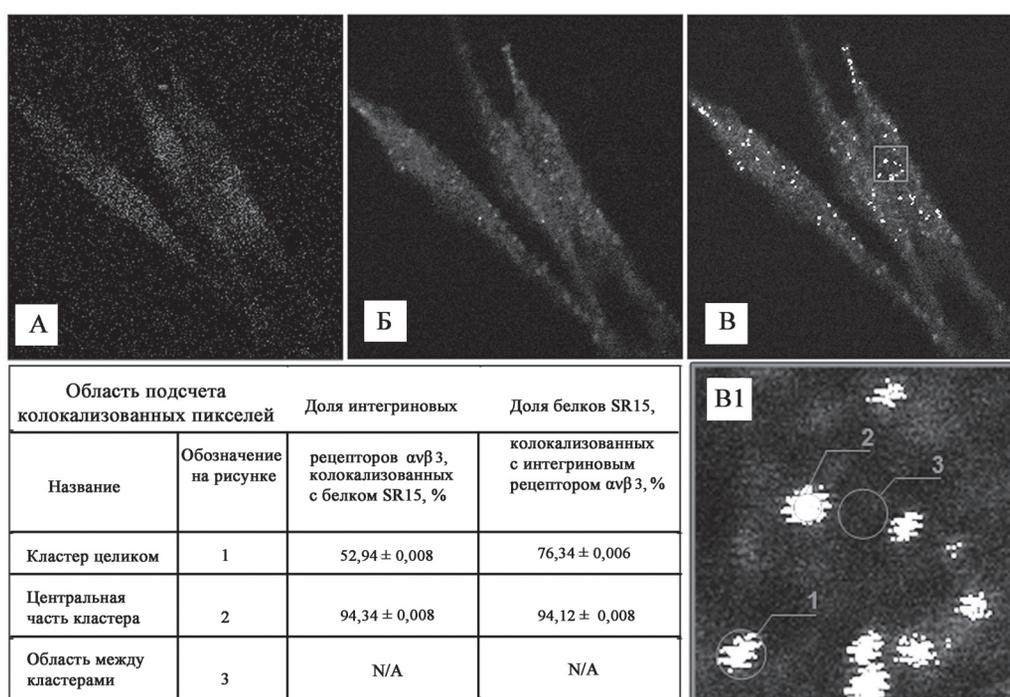


Рис. 4. Колокализация интегриновых рецепторов $\alpha\beta 3$ и белка SR15 в клетках линии MeWo. А – флуоресценция FITC (локализация белка SR15); Б – флуоресценция Alexa647 (локализация интегрин $\alpha\beta 3$); В – колокализованные точки; В1 – увеличенная область изображения В

ние фокальных контактов [37]. Имеются также примеры искусственно созданных молекул, содержащих несколько RGD-мотивов и способных связывать одновременно несколько интегриновых рецепторов $\alpha\beta 3$, что было подтверждено данными электронной микроскопии [28]. Кластеризацию интегриновых рецепторов $\alpha\beta 3$ вызывают также иммобилизованные на подложке близко расположенные RGD-содержащие лиганды [38–40]. В ряде работ также продемонстрировано, что мономерный RGD-мотив или моноклональное антитело к интегрину $\alpha\beta 3$ не способны вызвать кластеризацию данных рецепторов [41]. Предположительно, тетрамерный

белок SR15, содержащий в своем составе четыре RGD-мотива, обладает способностью к одновременному связыванию нескольких интегриновых рецепторов, индуцируя их кластеризацию на поверхности клеток.

Инкубация клеток с белком SR15 снижает их выживаемость

Блокировка интегриновых рецепторов может приводить к нарушению формирования интегрин-опосредованных функциональных контактов, обеспечивающих прикрепление клеток. Следствием этого является гибель клеток. Данный эффект описан в литературе в системах *in vitro* и *in vivo*.

Так, в одной из работ линейные RGD-миметики, связывающие интегрины $\alpha\beta3$ и $\alpha\beta5$, индуцировали гибель клеток, адгезия которых к субстрату была опосредована данными рецепторами [42]. Аналогично, пептид RGDfV индуцировал открепление и апоптоз клеток микрососудов мозга [43]. Наконец, модификация остатка аргинина в RGD- и GFOGER-мотивах коллагена IV типа, возникающая при гликемии, приводила к откреплению эндотелиальных клеток, результатом чего являлся апоптоз и нарушение ангиогенеза [44].

В данной работе нами было продемонстрировано, что инкубация клеток линии MeWo с агентами, блокирующими RGD-связывающие интегриновые рецепторы, снижает выживаемость таких клеток (рис. 5). Сравнение выживаемости клеток линии MeWo, инкубированных с белком SR15, пептидом GRGDS или антителом к интегринам $\alpha\beta3$, показало, что наибольшей эффективностью подавления роста клеток обладает белок SR15. Он снижает выживаемость клеток на 45%, а пептид и антитело – не более чем на 30% (рис. 5)

Вероятно, обработка клеток с помощью моноклонального антитела, пептида GRGDS или белка SR15 приводит к существенному снижению количества интегринов $\alpha\beta3$ на поверхности клеток, участвующих в прикреплении клеток к субстрату. По данным литературы, клетки метастатической меланомы характеризуются повышенной экспрессией молекулы интегрин $\alpha\beta3$ [5, 13]. Присутствие большого количества интегрин $\alpha\beta3$ на поверхности клеток линии MeWo может создавать предпосылки к тому, что данная молекула играет доминирующую роль в формировании контактов с матриксом и прикреплении клеток к подложке.

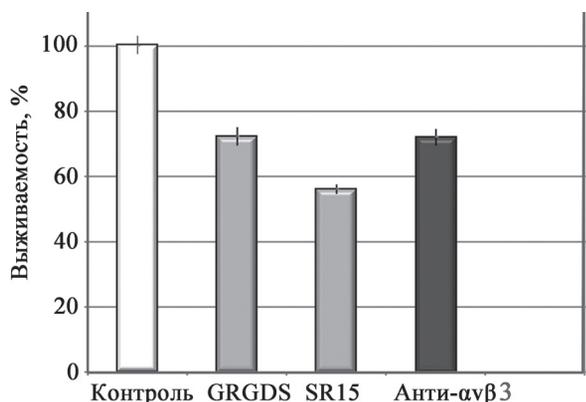


Рис. 5. Выживаемость клеток линии MeWo (ХТТ-тест), инкубированных с пептидом GRGDS либо гибридным рекомбинантным белком SR15, либо антителом к интегринам $\alpha\beta3$. Контроль – клетки, инкубированные в бессывороточной среде DMEM

Следовательно, блокировка интегринов $\alpha\beta3$ может приводить к гибели клеток вследствие их открепления.

Связывание поливалентного лиганда с последующей кластеризацией интегриновых рецепторов индуцирует ассоциацию с С-концевой областью интегрин целого ряда цитоплазматических белков. В такой агрегации принимает участие киназа фокальных контактов (ФАК) и молекулы цитоскелета, такие как F-актин, талин, α -актинин, тензин, винкулин, паксиллин и филамин [41]. Происходит формирование фокальных контактов, необходимых для прикрепления клеток к субстрату. С учетом вышесказанного можно предположить, что взаимодействие с белком SR15, приводящее к кластеризации рецепторов $\alpha\beta3$, распознается клеткой как сигнал к формированию фокальных контактов. Сигнал к формированию контактов в новых местах может служить причиной значительного ослабления существующих взаимодействий клетки с подложкой. Открепление клеток, спровоцированное сигналом-опосредованной разборкой комплексов, обеспечивающих ассоциацию клетки с подложкой, может быть более интенсивным, чем открепление, вызванное блокировкой свободных интегриновых рецепторов. Это, в свою очередь, может являться причиной наблюдаемого нами более низкого уровня выживаемости клеток, инкубированных в присутствии белка SR15, по сравнению с клетками, обработанными моноклональным антителом или пептидом GRGDS. Однако для подтверждения данной гипотезы необходимо проведение дополнительных экспериментов.

Таким образом, можно отметить, что создание молекул, презентующих несколько RGD-мотивов, представляет собой перспективное направление разработки противомеланомных препаратов и диагностических средств. Данные молекулы обладают способностью к высокоэффективному связыванию маркера метастазирующей меланомы (интегрин $\alpha\beta3$) и интернализации. Вместе с тем следует учитывать тот факт, что токсический эффект данных молекул, наблюдаемый в системе *in vitro*, может быть обусловлен активацией механизмов перестройки цитоскелета, вызывающих открепление клеток от субстрата. Тем не менее *in vivo* опухолевые клетки, участвующие в формировании метастазов, обладают способностью к выживанию в открепленном от матрикса состоянии [45]. Более того, эта способность позволяет им перемещаться с током крови и участвовать в диссеминации опухоли [46]. В данном случае индуцированное взаимодействием с лигандом от-

крепление клеток может ускорить процесс диссеминации и тем самым повысить агрессивность заболевания [47]. Все вышесказанное подчеркивает важность детального исследования механизмов RGD-опосредованной адгезии и изменения жизнеспособности опухолевых клеток в зависимости от прикрепления к субстрату.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 13-04-01875_А, 14-04-93105_НЦНИЛ_а, 15-54-16007_НЦНИЛ_а, 15-54-16016_НЦНИЛ_а), 16-34-60233 мол_а_дк. Использовано оборудование, приобретенное за счет средств Программы развития МГУ: Комплекс для клеточной сортировки на базе FACS Aria SORP (Becton, Dickinson and Company, США) и Конфокальная лазерная сканирующая система, производства «НИКОН КОРПОРЕЙШН» («Nikon», Япония).

Авторы выражают благодарность Ивану Андреевичу Воробьеву (кафедра клеточной биологии и гистологии Биологического факультета МГУ), а также Анастасии Архиповой и Михаилу Михайловичу Мойсеновичу (кафедра биоинженерии Биологического факультета МГУ) за содействие и помощь в проведении экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sloan E.K., Pouliot N., Stanley K.L., et al. // *Breast Cancer Res.* 2006. Vol. 8. N 2 P. R20.
2. Hynes R.O. // *Cell.* 2002. Vol. 110. N 6. P. 673.
3. Saudek V., Atkinson R.A., Pelton J.T. // *Biochemistry.* 1991. Vol. 30. N 30. P. 7369.
4. Varner J.A., Cheresh D.A. // *Curr Opin Cell Biol.* 1996. Vol. 8. N 5. P. 724.
5. Albelda S.M., Mette S.A., Elder D.E. et al. // *Cancer Res.* 1990. Vol. 50. N 20. P. 6757.
6. Hsu M.Y., Shih D.T., Meier F.E., et al. // *Am J Pathol.* 1998. Vol. 153. N 5. P. 1435.
7. Gladson C.L., Hancock S., Arnold M.M., et al. // *Am J Pathol.* 1996. Vol. 148. N 5. P. 1423.
8. Vonlaufen A., Wiedle G., Borisch B., Birrer S., Luder P., Imhof B.A. // *Mod Pathol.* 2001. Vol. 14. N 11. P. 1126.
9. Chattopadhyay N., Chatterjee A. // *J Exp Clin Cancer Res.* 2001. Vol. 20. N 2. P. 269.
10. Liapis H., Adler L.M., Wick M.R., Rader J.S. // *Hum Pathol.* 1997. Vol. 28. N 4. P. 443.
11. Sengupta S., Chattopadhyay N., Mitra A. et al. // *J Exp Clin Cancer Res.* 2001. Vol. 20. N 4. P. 585.
12. Pignatelli M., Cardillo M.R., Hanby A., Stamp G.W. // *Hum Pathol.* 1992. Vol. 23. N 10. P. 1159.
13. Gehlsen K.R., Davis G.E., Sriramarao P. // *Clin Exp Metastasis.* 1992. Vol. 10. N 2. P. 111.
14. Vogetseder A., Thies S., Ingold B. et al. // *Int J Cancer.* 2013. Vol. 133. N 10. P. 2362.
15. Mas-Moruno C., Rechenmacher F., Kessler H. // *Anti-cancer Agents Med Chem.* 2010. Vol. 10. N 10. P. 753.
16. Reardon D.A., Nabors L.B., Stupp R., Mikkelsen T. // *Expert Opin Investig Drugs.* 2008. Vol. 17. N 8. P. 1225.
17. Reynolds A.R., Hart I.R., Watson A.R. // *Nat Med.* 2009. Vol. 15. N 4. P. 392.
18. Syrkina M.S., Shirokov D., Rubtsov M. et al. // *Protein Engineering, Design and Selection.* 2012. Vol. 26. N 2. P. 143.
19. Рубцов М.А., Вейко В.П., Огорокова Н.А., Сыркина М.С., Замятнин А.А. Пат. РФ № 2563540. 2015.
20. Suter M., Cazin J., Jr., Butler J. E., Mock D.M. // *J. Immunol. Methods.* 1988. Vol. 113. N 1. P. 83.
21. Gruber G., Hess J., Stiefel C. et al. // *Br. J. Cancer.* 2005. Vol. 92. N 1. P. 41.
22. Bello L., Francolini M., Marthyn P. et al. // *Neurosurgery.* 2001. Vol. 49. N 2. P. 380.
23. Adachi M., Taki T., Higashiyama M. et al. // *Clin. Cancer Res.* 2000. Vol. 6. N 1. P. 96.
24. Plantefaber L.C., Hynes R.O. // *Cell.* 1989. Vol. 56. N 2 P. 281.
25. Pecheur I., Peyruchaud O., Serre C.-M. et al. // *FASEB J.* 2002. Vol. 16. N 9. 1266.
26. Сыркина М.С., Широков Д.А., Вейко В.П., Понов В.О., Рубцов М.А. Пат. РФ № RU 2012150079 А. 2014.
27. Pijuan-Thompson V., Gladson C.L. // *J Biol Chem.* 1997. Vol. 272. N 5. P. 2736.
28. Sancey L., Garanger E., Foillard S. et al. // *Mol Ther.* 2009. Vol. 17. N 5. P. 837.
29. Moncelet D., Bouchaud V., Mellet P. et al. // *PLoS One.* 2013. Vol. 8. N 12. P. e82777.
30. Schraa A.J., Kok R.J., Berendsen A.D. et al. // *Journal of Controlled Release.* 2002. Vol. 83. N 2. P. 241.
31. Barczyk M., Carracedo S. and D. Gullberg D. // *Cell and Tissue Research.* 2010. Vol. 339. N 1. P. 269.
32. Beaulieu J. F. // *Progress in Histochemistry and Cytochemistry.* 1997. Vol. 31. N 4. P. 1.
33. Pozzi A., Zent R. // *Current Opinion in Cell Biology.* 2011. Vol. 23. N 5 P. 547.
34. D. Sheppard // *BioEssays.* 1996. Vol. 18. N 8. P. 655.
35. Ly D.P., Zazzali K.M., Corbett S.A. // *J Biol Chem.* 2003. Vol. 278. N 24. P. 21878.
36. Maheshwari G, Brown G, Lauffenburger DA, Wells A, Griffith LG. // *J Cell Sci.* 2000. Vol. 113. N 10. P. 1677.
37. Yamada K.M., Geiger B. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997. Vol. 9. N 1. P. 76.
38. Arnold M., Hirschfeld-Warneken V.C., Lohmüller T. et al. // *Nano Lett.* 2008. Vol. 8. N 7. P. 2063.
39. Jiang G.Y., Giannone G., Critchley D.R. et al. // *Nature.* 2003. Vol. 424. N 6946. P. 334.
40. Schwartzman M., Palma M., Sable J. et al. // *Nano Lett.* 2011. Vol. 11. N 3. P. 1306.
41. Miyamoto S., Akiyama S.K., Yamada K.M. // *Science.* 1995. Vol. 267. N 5199. P. 883.
42. Maubant S., Saint-Dizier D., Boutillon M. et al. // *Blood.* 2006. Vol. 108. N9. P. 3035.
43. Erdreich-Epstein A., Tran L.B., Cox O.T. et al. // *Blood.* 2005. Vol. 105. P. 4353.
44. Dobler D., Ahmed N., Song L. et al. // *Diabetes.* 2006. Vol. 55. N 7. P. 1961.

45. Freedman V.H., Cellular S.S. // Cell. 1974. Vol. 3. P. 355.
46. Vasiliev J.M., Omelchenko T., Gelfand I.M., Feder H.H., Bonder E.M. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2004. Vol. 101. 34. P. 12526.
47. SefTOR R.E., SefTOR E.A., Gehlsen K.R. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1992. Vol. 89. N 5. P. 1557.

Поступила в редакцию 04.07.16

TETRAMERIC RGD INDUCES CLUSTERING OF INTEGRIN $\alpha v \beta 3$ ON THE MELANOMA CELL SURFACE AND DECREASE OF CELL VIABILITY

M.A. Rubtsov^{1,2,6}, A.A. Maslakova^{1,2,3}, D.M. Potashnikova⁴, V.P. Veiko⁵, M.S. Syrkina^{1,2,5}

¹Department of Molecular Biology, Faculty of Biology M.V.Lomonosov Moscow State University; ²LIA 1066 French-Russian Joint Cancer Research Laboratory; ³Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology M.V.Lomonosov Moscow State University; ⁴Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology M.V.Lomonosov Moscow State University; ⁵Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences; ⁶Innovation Management Department/ Department of Biochemistry, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; e-mail: krimsy@yandex.ru

The recombinant hybrid protein SR15 composed of streptavidin fused with RGD-bearing peptide was obtained. It's selective binding to human melanoma cells (MeWo) was demonstrated. Composition of the RGD-binding integrins on the surface of MeWo cells was identified. It was established that the recombinant protein SR15 binds to integrin $\alpha v \beta 3$ on the surface of human melanoma cells. It was also shown that such binding induces clustering of $\alpha v \beta 3$ receptors on the surface of MeWo cells with following internalization of the recombinant protein and results in twofold decrease in cell viability.

Key words: RGD, streptavidin, human melanoma, MeWo, integrin, $\alpha v \beta 3$, receptor clustering.

Сведения об авторах: Рубцов Михаил Александрович – вед. науч. сотр. кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, гл. спец. отдела управления инновационной деятельностью ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, канд. биол. наук (ma_rubtsov@mail.ru); Маслакова Айтсана Алексеевна – мл. науч. сотр. кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, мл. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (aitsana.dokrunova@gmail.com); Поташикова Дарья Марковна – науч. сотр. кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. биол. наук (dariatashnikova@yandex.ru); Вейко Владимир Петрович – гл. науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, докт. биол. наук, профессор (vladveiko@yahoo.com); Сыркина Марина Сергеевна – ст. науч. сотр. кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. биол. наук (krimsy@yandex.ru).