

УДК 617.51/.53-006.61:576.322:577.2

Связь экспрессии мРНК кальпаинов 1 и 2 и мРНК белков, участвующих в перестройке цитоскелета

Г. В. Какурина*, Е. С. Колегова, Е. Е. Шашова, О. В. Черемисина, Е. Л. Чойнзонов, И. В. Кондакова

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, 634009 Россия

*E-mail: kakurinagv@oncology.tomsk.ru

Поступило в редакцию 16.03.2019

Принято к печати 07.02.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.10947

РЕФЕРАТ Ремоделирование цитоскелета лежит в основе различных клеточных процессов, в том числе ассоциированных с метастазированием, что делает актуальным изучение роли протеаз и белков, участвующих в перестройке цитоскелета. Однако данные о связи уровней экспрессии мРНК кальпаинов 1 и 2 (CAPN1 и 2) и мРНК белков, ассоциированных с ремоделированием цитоскелета, отсутствуют. Существование связи между уровнями экспрессии мРНК CAPN1 и 2 и белков, участвующих в перестройке цитоскелета: маркеров клеточной подвижности (SNAI1, VIM, RND3) и актинсвязывающих белков (АСБ) кофилина (CFN1), профилина (PFN1), эзрина (EZR), фасцина (FSCN1) и белка 1, ассоциированного с аденилилциклазой (CAP1), изучено нами на модели высокоагрессивного плоскоклеточного рака гортани и гортаноглотки (РГ). Уровень экспрессии генов определяли методом обратной транскрипции с ПЦР в реальном времени и рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ в парных образцах ткани, полученных от 44 больных РГ ($T_{1-4}N_{0-2}M_0$). Сформированы группы больных с низкой и высокой экспрессией генов CAPN1 и 2. Отмечено, что метастазирование РГ связано с высоким уровнем экспрессии CAPN1 на фоне снижения уровня экспрессии VIM и CAP1. Высокий уровень CAPN2 сопровождался повышением уровня экспрессии EZR, что может свидетельствовать об активации процессов инвазии. Результаты работы необходимо подтвердить на увеличенной выборке больных и генов-мишеней. Полученные данные важны для выяснения механизмов метастазирования, что позволит в дальнейшем определить новые маркеры прогрессии РГ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ремоделирование цитоскелета, клеточная подвижность, экспрессия генов, актинсвязывающие белки, плоскоклеточный рак гортани и гортаноглотки, метастазирование.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ CAP1 – белок 1, ассоциированный с аденилилциклазой; РГ – плоскоклеточный рак гортани и гортаноглотки; АСБ – актинсвязывающие белки; CFN1 – кофилин; PFN1 – профилин; EZR – эзрин; FSCN1 – фасцин; CAPN1 – кальпаин 1; CAPN2 – кальпаин 2.

ВВЕДЕНИЕ

Характерный для клеток опухоли высокий пролиферативный и миграционный потенциал тесно связаны с изменением механики мембран, ассоциированной с ремоделированием цитоскелета. Для понимания механизмов опухолевого роста актуально детальное изучение процессов перестройки цитоскелета. В процессах реорганизации цитоскелета участвуют различные белки: регуляторные (транскрипционные факторы: Snai1, Slug, ZEB, Twist), сигнальные (семейство малых GTP-аз RhoA, семейство протеинкиназ B и др.), адгезивные молекулы, протеазы (металлопротеазы, кальпаины, протеасомы и др.), белки цитоскелета (белки промежуточных филаментов (виментин, кератины и др.), актинсвязывающие белки (АСБ) и др.) [1–4].

Известно, что кальпаины – внутриклеточные Ca^{2+} -зависимые цистеиновые протеазы – участвуют в регуляции ремоделирования цитоскелета. Кальпаины имеют широкий спектр субстратов: белки цитоскелета, факторы транскрипции, различные ферменты, а их направленное ингибирование можно считать аналогичным блокированию разнообразных сигнальных путей [3, 4]. Динамика актина регулируется большим семейством АСБ, служащих субстратами кальпаинов. Вклад АСБ, участвующих в ремоделировании актинового цитоскелета, в опухолевую прогрессию и метастазирование имеет фундаментальное значение [5–8]. В настоящее время активно изучается роль тандема АСБ и протеаз в процессах опухолевого роста [7, 8]. Поэтому связь между уровнем

экспрессии генов *CAPN1* и *2* и генов маркеров клеточной подвижности (*SNAI1*, *VIM*, *RND3*) и актинсвязывающих белков кофилина (*CFN1*), профилина (*PFN1*), эзрина (*EZR*), фасцина (*FSCN1*) и белка 1, ассоциированного с аденилилциклазой (*CAP1*), изучена нами на модели высокоагрессивного рака гортани и гортаноглотки (РГ).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материал и характеристика групп

В работе использовали парные образцы опухолевой и морфологически неизменной ткани гортани и гортаноглотки, полученные при видеоларингоскопии от 44 больных, поступивших на лечение в НИИ онкологии ТНИМЦ РАН. Диагноз был гистологически верифицирован как плоскоклеточный рак гортани и гортаноглотки (РГ), стадии $T_{1-4}N_{0-2}M_0$ ($T_{1-4}N_0M_0 - 21$, $T_{1-4}N_1M_0 - 16$, $T_{1-4}N_2M_0 - 7$). Средний возраст больных составил 56 ± 7 лет. Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основными законами РФ об охране здоровья граждан», получено разрешение этического комитета института. Образцы тканей помещали в раствор RNeasy (Qiagen, США), хранили при температуре -80°C до анализа.

Методы исследования

Суммарную мРНК выделяли с помощью набора RNeasy (Qiagen, США) согласно протоколу производителя. Качество мРНК оценивали с помощью капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, США) и набора R6K ScreenTape (Agilent Technologies, США). кДНК получали на матрице мРНК с помощью набора реагентов для обратной транскрипции ОТ-1 («Синтол», Москва) согласно протоколу производителя. Уровень экспрессии мРНК оценивали методом ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) по технологии Sybr Green на амплификаторах iCycler (Bio-Rad, США) и рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta CT}$. Праймеры подобраны с помощью программы Vector NTI Advance 11.5 и базы данных NCBI. Последовательности праймеров приведены в таблице [7]. В качестве референсного

гена использовали ген *GAPDH* «домашнего хозяйства». Продукты реакции оценивали с помощью капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, США) и использовали анализ кривой плавления (Rotor Gene 6000).

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием непараметрических критериев: тестов Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса и рангового теста множественных сравнений, коэффициента корреляции Спирмена, коэффициента корреляции Кенделла. Результаты приведены как $M \pm m$, где M – среднее, m – стандартное отклонение; n – количество человек в группе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Больные были разделены на группы с низкой экспрессией *CAPN1*: «L-capn1» от 0.0 до 5.1 ($n = 24$) и высокой экспрессией «H-capn1» от 5.03 и выше ($n = 20$); с низкой экспрессией *CAPN2* «L-capn2» от 0.0 до 2.0 ($n = 23$) и высокой экспрессией «H-capn2» от 2.01 и выше ($n = 21$). Высокий уровень экспрессии *CAPN1* в представленной выборке больных РГ был связан с наличием регионарных метастазов ($r = 0.4$, $p \leq 0.05$), а связь уровня экспрессии *CAPN2* с метастатическим статусом на данном этапе была незначимой ($r \geq 0.3$, $p = 0.055$). Можно предположить, что увеличение использованной выборки больных РГ позволит выявить значимую ассоциацию экспрессии *CAPN2* с метастазированием.

Анализ экспрессии генов *SNAI1*, *RND3* и *VIM*, кодирующих маркеры клеточной подвижности, показал, что на фоне высокого уровня экспрессии *CAPN1* уровень экспрессии *VIM* был значимо ниже (табл. 1). Зависимость уровня экспрессии мРНК *SNAI1*, *RND3* и *VIM* от наличия метастазов была на уровне тенденций. Полученные результаты не согласуются с данными [6] и могут быть связаны с особенностями метастазирования рака гортани, что нуждается в проведении дополнительных исследований.

Сравнение профиля экспрессии актинсвязывающих белков и уровня экспрессии протеаз (табл. 2) выявило статистически значимо низкий уровень экс-

Таблица 1. Уровень экспрессии мРНК генов, кодирующих маркеры клеточной подвижности, в зависимости от уровня экспрессии генов, кодирующих протеазы

Ген	L-capn1	H-capn1	P1	L-capn2	H-capn2	P2
<i>SNAI1</i>	3.89±5.09	0.43±0.54	0.11	2.56±5.28	3.54±7.17	0.88
<i>VIM</i>	25.31±12.6	6.8±11.08	0.04	19.26±25.89	22.52±34.62	0.98
<i>RND3</i>	5.7±11.8	20.33±26.59	0.28	19.88±43.44	11.72±21.60	0.54

Примечание: P1 и P2 – статистическая значимость различий с группой «L-capn1» и «L-capn2» соответственно.

Таблица 2. Уровень экспрессии мРНК генов, кодирующих белки, ассоциированные с ремоделированием цитоскелета, в зависимости от уровня мРНК протеаз

Ген	L-capn1	H-capn1	P1	L-capn2	H-capn2	P2
<i>FSCN1</i>	5.06±8.19	12.91±24.56	0.52	11.45±21.34	5.96±9.01	0.93
<i>EZR</i>	16.37±24.03	17.31±45.88	0.56	8.92±17.61	31.38±13.96	0.02
<i>PFN1</i>	6.95±12.23	11.76±22.59	0.90	24.30±45.43	7.12±9.44	0.74
<i>CFN1</i>	19.57±25.75	16.67±28.61	0.39	14.28±25.32	21.64±26.97	0.26
<i>CAP1</i>	20.30±29.7	9.97±16.2	0.05	18.70±32.08	14.16±24.26	0.54

Примечание: P1 и P2 – статистическая значимость различий с группой «L-capn1» и «L-capn2» соответственно.

прессии *CAP1* на фоне высокого уровня экспрессии *CAPN1*. Снижение уровня экспрессии *CAP1* в образцах РГ не согласуется с ранее полученными результатами, согласно которым содержание белка *CAP1* увеличивается при развитии опухолевого процесса [7]. Роль *CAP1* в процессах опухолевого роста до сих пор не установлена [7], отсутствуют также данные о коэкспрессии этого белка и протеаз.

В группе с высокой экспрессией *CAPN2* отмечена высокая экспрессия гена, кодирующего эзрин – субстрат кальпаина 1 [8]. Однако в нашей работе экспрессия *EZR* увеличивалась в 3.8 раза на фоне высокой экспрессии *CAPN2* и не была связана с уровнем экспрессии *CAPN1*. Высокий уровень эзрина и экспрессии *CAPN2* связывают с высокой скоростью сборки–разборки фокальных контактов [8]. Причем показано [8], что эзрин необходим для кальпаин-опосредованного протеолиза талина, киназы фокальных контактов и кортактина. Выявленная нами коэкспрессия *CAPN2* и *EZR* может говорить об увеличении скорости процессов ассоциации–диссоциации в фокальных контактах, которые свидетельствуют о приобретении мобильности опухолевыми клетками. Нужно отметить, что высокий уровень эзрина связывают с низкой выживаемостью онкологических больных [9]. В настоящий момент не представляется возможным говорить о связи коэкспрессии *CAPN2* и *EZR* с метастазированием рака гортани. Вероятно, этот механизм используется в других процессах, в частности, при инвазии опухолевых клеток.

Корреляционный анализ в представленных выборках больных РГ с разным уровнем экспрессии генов протеаз показал, что на фоне низкой экспрессии *CAPN1* наблюдалась средней силы корреляция между уровнем *VIM* и *CAP1*, *EZR* и *CAPN2* и уровнем *PFN1* и *CFN1* ($r \geq 0.6$, $p \leq 0.05$). При высоком уровне экспрессии *CAPN1* наблюдалось появление взаимосвязи между экспрессией *SNAI1* и *PFN1*, *VIM* и *RND3*, *CAP1* и *CFN1* ($r \geq 0.6$, $p \leq 0.05$). Учитывая, что высокий уровень экспрессии *CAPN1* в основном связан с наличием регионарных метастазов ($r = 0.4$, $p \leq 0.05$), можно предположить активацию процессов

эпителиально-мезенхимального перехода. На фоне изменения экспрессии *CAPN2* также происходило переключение связей между экспрессией генов белков, участвующих в реализации клеточной подвижности. При низком уровне экспрессии *CAPN2* наблюдалась корреляция средней силы между уровнем экспрессии *FSCN1* и *PFN1*, *PFN1* и *CFN1* ($r \geq 0.6$, $p \leq 0.05$). Средняя связь между уровнем экспрессии *CAP1*, *PFN1* и *CFN1* ($r \geq 0.6$, $p \leq 0.05$) отмечена на фоне высокой экспрессии *CAPN2*. Итак, уровень экспрессии *CAPN2* в данной выборке пациентов коррелировал с экспрессионным профилем АСБ и не был связан с метастатическим статусом ($r \geq 0.3$, $p = 0.055$) РГ. Вероятно, при увеличении выборки больных РГ могут быть получены значимо ассоциированные результаты. Возможно, уровень экспрессии и значимые корреляции кальпаинов 1 и 2 с клинико-морфологическими характеристиками зависят от других характеристик опухоли [10] или связаны с важной ролью других членов семейства кальпаинов в патогенезе РГ [11, 12].

Метастатический потенциал опухоли определяется приобретением опухолевыми клетками атипичных морфофункциональных и молекулярно-генетических свойств, приводящих к неконтролируемому росту, пролиферации и появлению локомоторного фенотипа. Мобильность опухолевых клеток связана с трансформацией актинового цитоскелета, что сопровождается изменениями в составе, функциях и активности различных белков и их генов [2, 6–8]. Так, результаты нашей работы говорят о том, что метастазирование ассоциировано с высоким уровнем экспрессии *CAPN1* в сочетании с низким уровнем экспрессии *VIM* и *CAP1*. Снижение экспрессии *VIM* несколько противоречит принятым суждениям и требует более тщательной проверки с включением большего числа пациентов и генов-мишеней, которые могут быть задействованы в альтернативных путях регуляции метастазирования. Уровень экспрессии *CAPN2* не имел значимой связи с лимфогенным метастазированием у пациентов с РГ в нашей выборке. Высокий уровень этой протеазы сопровождался

высоким уровнем экспрессии *EZR*, что косвенно может указывать на активацию процессов инвазии [9, 10]. В целом, результаты подтверждаются данными о тканеспецифичности кальпаинов, например о связи рака гортани с *CAPN10* [11], а уровень экспрессии *CAPN6* отрицательно коррелирует с исходом заболевания у больных плоскоклеточным раком головы и шеи [12]. Тем не менее результаты нашего исследования говорят о необходимости детального изучения возможных молекулярных механизмов взаимодействия кальпаиновой системы и белков, ассоциированных с ремоделированием цитоскелета, на транскриптомном и протеомном уровне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На представленной выборке больных РГ нами обнаружено, что уровень экспрессии *CAPN1* связан с уровнем экспрессии генов белков цитоскелета – ви-

ментина и *CAP1*, участвующих в ремоделировании цитоскелета. Уровень экспрессии *CAPN2* коррелировал с экспрессией мРНК эзрина, белка-линкера между плазматической мембраной и актиновым цитоскелетом, высокий уровень которого ассоциирован с инвазивным ростом [10]. Лимфогенное метастазирование у больных РГ коррелировало с высоким уровнем экспрессии *CAPN1*, уровень *CAPN2* не имел такой связи. Результаты представленной работы говорят о необходимости дополнительных исследований на увеличенной выборке пациентов с расширением панели генов-мишеней, которые теоретически могут участвовать в рабочем тандеме кальпаины–белки цитоскелета. Полученные данные важны для выяснения механизмов метастазирования и опухолевой прогрессии, что в последующем позволит найти новые маркеры прогрессии плоскоклеточного рака гортани и гортаноглотки. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Izdebska M., Zielińska W., Grzanka D., Gagat M. // *BioMed. Res. Int.* 2018. V. 2018. P. 4578373. doi: 10.1155/2018/4578373.
- Jie W., Andrade K.C., Lin X., Yang X., Yue X., Chang J. // *Compr. Physiol.* 2015. V. 6. № 1. P. 169–186.
- Leloup L., Wells A. // *Expert Opin. Ther. Targets.* 2011. V. 15. № 3. P. 309–323.
- Del Carmen L.N.M., Conacci-Sorrell M. // *Methods Mol. Biol.* 2019. V. 1915. P. 149–160.
- Pollard T.D. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2016. V. 8. № 8. P. a018226.
- Yang X., Lin Y. // *Oncol. Lett.* 2018. V. 15. № 3. P. 2743–2748.
- Kakurina G.V., Kondakova I.V., Spirina L.V., Kolegova E.S., Shashova E.E., Cheremisina O.V., Novikov V.A., Choinzonov E.L. // *Bull. Exp Biol. Med.* 2018. V. 166. № 2. P. 250–252.
- Hoskin V., Szeto A., Ghaffari A., Greer P.A., Côté G. P., Elliott B. E. // *Mol. Biol. Cell.* 2015. V. 26. № 19. P. 3464–3479.
- Li J., Wei K., Yu H., Jin D., Wang G., Yu B. // *Sci. Rep.* 2015. V. 3. № 5. P. 17903.
- Yu L.M., Zhu Y.S., Xu C.Z., Zhou L.L., Xue Z.X., Cai Z.Z. // *Clin. Transl. Oncol.* 2019. V. 21. № 7. P. 924–932. doi: 10.1007/s12094-018-02006-6.
- Moreno-Luna R., Abrante A., Esteban F., González-Moles M.A., Delgado-Rodríguez M., Sáez M.E., González-Pérez A., Ramírez-Lorca R., Real L.M., Ruiz A. // *Head Neck.* 2011. V. 33. № 1. P. 72–76. doi: 10.1002/hed.21404.
- Xiang Y., Li F., Wang L., Zheng A., Zuo J., Li M., Wang Y., Xu Y., Chen C., Chen S., et al. // *Oncol. Lett.* 2017. V. 13. № 4. P. 2237–2243.