

БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА,  
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 57.042.2

**ИНГИБИТОР АТФазы SERCA ТАПСИГАРГИН ЭФФЕКТИВНО ПОДАВЛЯЕТ  
ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКА S100A4 В КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

**А. П. Котнова\***, Б. М. Льянова, Е. А. Духанина, Т. Н. Порцева, академик РАН Ю. В. Ильин,  
член-корреспондент РАН С. Г. Георгиева, А. Г. Степченко, Е. В. Панкратова

Поступило 18.12.2018 г.

В клетках рака молочной железы MDA-MB231 тапсигаргин (ингибитор АТФазы SERCA) подавлял экспрессию маркера метастазирования S100A4. Обнаружили, что транскрипция гена *S100A4* находится под контролем  $Ca^{2+}$ -сигнальных путей. Установили, что синтез мРНК и белка S100A4 в линии MDA-MB231 эффективно подавляется тапсигаргином в концентрации 0,4–4 мкм с сохранением выживаемости клеток. Мы предполагаем, что изменение транскрипции гена в ответ на нарушение гомеостаза  $Ca^{2+}$  играет прямую роль в ремоделировании  $Ca^{2+}$ -сигнальных путей.

*Ключевые слова:* S100A4, ингибиторы, тапсигаргин, метастазирование.

**DOI:** <https://doi.org/10.31857/S0869-56524862255-257>

Белок S100A4 (также известен как метастазин-1) — это кальцийсвязывающий протеин, вовлечённый в развитие карциномы и являющийся маркером перерождения клеток из эпителиальных в мезенхимальные. Он способствует выживаемости клеток опухоли, опухолевой пролиферации, ангиогенезу, инвазии и метастазированию, а также индуцированному опухолью воспалению. Вследствие этого экспрессия S100A4 связана с прогрессией опухолей и может быть идентифицирована как прогностический показатель для ряда злокачественных новообразований человека [1]. Рост уровня экспрессии этого белка коррелирует с высокой частотой метастазирования и крайне негативными прогнозами выживания при некоторых видах онкологических заболеваний [2, 3]. Кроме того, высокий уровень экспрессии S100A4 способствует развитию фиброзных и воспалительных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, сердечная гипертрофия и фиброз почек [4, 5]. Таким образом, в последние годы S100A4 привлекает к себе повышенное внимание исследователей во всём мире как потенциальная мишень для терапии.

Ранее нами было показано [6], что снижение экспрессии S100A4 в опухолевых клетках вызывает достоверное угнетение роста опухоли и положительно влия-

ет на динамику выживания мышей, привитых меланомой М3. Поэтому особый интерес вызывает поиск внутриклеточных сигнальных путей, под контролем которых находится экспрессия гена *S100A4*. Поскольку S100A4 является кальцийсвязывающим белком, мы предположили, что его уровень в клетках может изменяться под действием тапсигаргина, сильно ингибирующего АТФазу SERCA (sarco/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase) и, как следствие, значительно повышающего уровень  $Ca^{2+}$  в цитоплазме.

Настоящее сообщение посвящено проверке нашей гипотезы. В работе использовали клетки триплетотрицательной линии рака молочной железы MDA-MB-231. В клетках этой линии отсутствуют эстрогеновый рецептор, рецептор прогестерона и рецептор Her-2, что характеризует данную линию как очень агрессивный подтип рака молочной железы, который трудно поддаётся лечению.

Влияние тапсигаргина оценивали по содержанию в клетках белка S100A4 и на транскрипционном уровне. Поскольку гомеостаз  $Ca^{2+}$  и активность SERCA представляют собой узловую точку, контролирующую выживание клеток [7], мы также оценивали жизнеспособность клеточных культур после обработки этим ингибитором

Клетки высевали в 6-луночные планшеты по  $3,5 \cdot 10^5$  на лунку в среде DMEM в присутствии 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки. На следующий день к клеткам добавляли ингибитор тапсигаргин

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта  
Российской Академии наук, Москва*

\*E-mail: [alina\\_kotnova@mail.ru](mailto:alina_kotnova@mail.ru)

(Thapsigargin, “Sigma-Aldrich”, США) в концентрациях 0,4 и 4 мкМ. Через 24 ч определяли жизнеспособность клеток, содержание в них белка S100A4 и РНК.

Содержание S100A4 определяли методом конкурентного иммуноферментного анализа в модификации, разработанной в нашей лаборатории [8], концентрацию общего белка в клетке — по методу Бредфорд. Окончательные значения концентрации S100A4 выражали в микрограммах на миллиграмм общего белка. Для оценки влияния тапсигаргина на уровень транскрипции S100A4 из клеточной культуры выделяли РНК тризольным методом, после чего проводили обратную транскрипцию с использованием набора Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (“Thermo Scientific”, США) и ПЦР в реальном времени с использованием праймеров, специфичных к гену *S100A4*. Для определения жизнеспособности клеток их инкубировали 24 ч и за 1,5 ч до окончания инкубации вносили 20 мкл реагента CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (“Promega Corporation”, США). Измерения проводили на планшетном спектрофотометре при 490 нм. За единицу принимали значения в лунках без добавления ингибитора. Результаты экспериментов представлены на рис. 1.

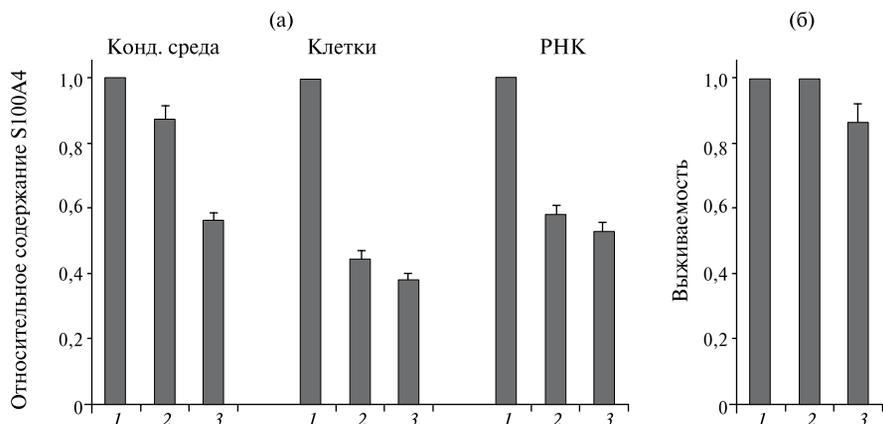
Из рисунка видно, что обработка клеток тапсигаргином привела к значительному снижению в них уровня белка S100A4, а также к уменьшению его секреции в культуральную среду. Транскрипция гена *S100A4* в клетках MDA-MB-231 эффективно подавлялась тапсигаргином в концентрации 0,4 и 4 мкМ. Однако эти изменения не привели к значительному снижению жизнеспособности клеток под действием выбранных концентраций тапсигаргина (рис. 1б).

Из полученных результатов следует, что транскрипция гена *S100A4* находится под контролем  $Ca^{2+}$ -сигнальных путей. В клетках опухоли молочной железы MDA-MB-231 под действием тапсигаргина существенно снизилось содержание мРНК и белка S100A4.

Внутриклеточный  $Ca^{2+}$  является критическим координатором различных аспектов клеточной физиологии. Одним из главных белков для поддержания гомеостаза  $Ca^{2+}$  является АТФаза SERCA, активно “закачивающая” высвобожденный  $Ca^{2+}$  обратно в саркоплазматический/эндоплазматический ретикулум [7].

Ранее было показано [9], что подавление экспрессии SERCA с помощью интерферирующих РНК приводит к изменению транскрипции генов, непосредственно связанных с активацией компенсаторных механизмов и ремоделингом  $Ca^{2+}$ -сигнального пути. Механизм ремоделирования основывается на транскрипционной активации генов TRPC4, TRPC5, NCX и ведёт к изменению экспрессии белков, непосредственно участвующих в импорте и экспорте  $Ca^{2+}$ . Также увеличивается экспрессия некоторых транскрипционных факторов (Sp1, MEF2, NFATc4).

Изучаемый нами белок S100A4 активно участвует в  $Ca^{2+}$ -зависимых сигнальных путях клетки. Экспрессия белков S100 снижает внутриклеточный уровень  $Ca^{2+}$  после стимуляции пуринергических рецепторов P2Y и приводит к буферизации уровня  $Ca^{2+}$ . Белки S100 представляют собой небольшие (10–12 кДа) белки, содержащие две “руки” EF, и образуют самую большую семью в суперсемействе белков EF-hand. “Руки” EF представляют собой высокоаффинные  $Ca^{2+}$ -связывающие мотивы, фланки-



**Рис. 1.** Влияние тапсигаргина на выживаемость клеток MDA-MB-231 и экспрессию в них S100A4 в норме (без обработки ингибитором) — 1; 2 — обработка тапсигаргином в концентрации 0,4 мкМ; 3 — обработка тапсигаргином в концентрации 4 мкМ. а — содержание белка S100A4 в кондиционной среде и внутриклеточно. Содержание мРНК нормировали по гену *Gus*. б — жизнеспособность клеток в относительных единицах от контроля (группа 1).  $M \pm m$ ,  $n = 3$ .

рованные  $\alpha$ -спиралями с обеих сторон. Белки S100 формируют гомо- и гетеродимеры с белками собственной семьи или другими неродственными белками. Эта димеризация происходит в гидрофобной области, которая раскрывается после связывания  $\text{Ca}^{2+}$ . Аминокислоты, образующие гидрофобную расщелину, определяют специфичность их связывания с разными белками, такими как p53, аннексин A2 (ANXA2) или Ndr-киназа [10, 11].

В работе [10] было показано, что одной лишь мутации интерфейса димеризации было достаточно, чтобы отменить влияние сверхэкспрессии S100A4 на сигнальные пути  $\text{Ca}^{2+}$ . Таким образом, S100A4 может влиять на сигнальные пути за счёт связывания и модуляции других  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнальных белков, и одного лишь связывания  $\text{Ca}^{2+}$  с S100A4 недостаточно для получения буферного эффекта. Мы предполагаем, что изменение транскрипции гена *S100A4* в ответ на нарушение гомеостаза  $\text{Ca}^{2+}$  прямо влияет на процессы ремоделирования  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнальных путей.

Тот факт, что тапсигаргин способен существенно снижать уровень S100A4 в клетках рака молочной железы, позволяет предположить, что лекарственные препараты, разрабатываемые на основе тапсигаргина, например Mirpsagargin [12], будут не только вызывать некроз опухоли, но и предотвращать развитие метастазов за счёт подавления активности S100A4, продлевая стадию ремиссии у пациентов.

**Источники финансирования.** Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 14–5–01032-П и Программы фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг. (тема № 01201363822).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stewart R.L., Carpenter B.L., West D.S., Knifley T., Liu L., Wang C., Weiss H.L., Gal T.S., Durbin E.B., Arnold S.M., O'Connor K.L., Chen M. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 23. P. 34630–34642.
2. Helfman D.M., Kim E.J., Lukanidin E., Grigorian M. // *Brit. J. Cancer*. 2005. V. 92. № 11. P. 1955–1958.
3. Garrett S.C., Varney K.M., Weber D.J., Bresnick A.R. // *J. Biol. Chem*. 2006. V. 281. № 2. P. 677–680.
4. Schneider M., Hansen J.L., Sheikh S.P. // *J. Mol. Med*. 2008. V. 86. № 5. P. 507–522.
5. Grigorian M., Ambartsumian N., Lukanidin E. // *Curr. Mol. Med*. 2008. V. 8. № 6. P. 492–496.
6. Духанина Е.А., Лукьянова Т.И., Духанин А.С., Георгиева С.Г. // *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2017. Т. 164. № 11. С. 614–616.
7. Chemaly E.R., Troncone L., Lebeche D. // *Cell Calcium*. 2018. V. 69. P. 46–61.
8. Духанина Е.А., Лукьянова Т.И., Романова Е.А., Духанин А.С., Сащенко Л.П. // *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2008. Т. 145. № 1. С. 85–88.
9. Seth M., Sumbilla C., Mullen S.P., Lewis D., Klein M.G., Hussain A., Soboloff J., Gill D.L., Inesi G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 47. P. 16683–16688.
10. Lorenz S., Aust G., Krohn K. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. V. 1833. № 12. P. 2703–2713.
11. Malashkevich V.N., Dulyaninova N.G., Ramagopal U.A., Liriano M.A., Varney K.M., Knight D., Brenowitz M., Weber D.J., Almo S.C., Bresnick A.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 19. P. 8605–8610.
12. Andersen T.B., López C.Q., Manczak T., Martinez K., Simonsen H.T. // *Molecules*. 2015. V. 20. № 4. P. 6113–6127.

## THAPSIGARGIN, INHIBITOR OF SARCO-ENDOPLASMIC $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, EFFECTIVELY SUPPRESSES THE EXPRESSION OF S100A4 IN HUMAN BREAST CANCER CELL LINE

A. P. Kotnova, B. M. Lyanova, E. A. Dukhanina, T. N. Portseva,  
Academician of the RAS Yu. V. Ilyin, Corresponding Member of the RAS S. G. Georgieva,  
A. G. Stephenko, E. V. Pankratova

Received December 18, 2018

Thapsigargin, the SERCA ATPase inhibitor, effectively suppresses the expression of metastasis marker S100A4 in breast cancer cells MDA-MB231. It has been demonstrated that transcription of the *S100A4* gene is controlled by  $\text{Ca}^{2+}$ -signaling pathways. It has been shown that synthesis of S100A4 mRNA and protein in the MDA-MB231 cell line is effectively inhibited by thapsigargin at a concentration of 0.4–4  $\mu\text{M}$ , while preserving cell survival. We assume that a change in gene transcription in response to the disruption of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis plays a direct role in the remodeling of  $\text{Ca}^{2+}$ -signaling pathways.

**Keywords:** S100A4, inhibitors, thapsigargin, metastasis.