УДК 616-006.6

# ВОВЛЕЧЕННОСТЬ SASH1 В ПОДДЕРЖАНИЕ СТАБИЛЬНОЙ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ\*

© 2020 А.С. Ильницкая, И.Ю. Житняк, Н.А. Глушанкова\*\*

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 115478 Москва, Россия; электронная noчта: natglu@hotmail.com

> Поступила в редакцию 01.04.2020 После доработки 29.04.2020 Принята к публикации 03.05.2020

SASH1 является адаптерным сигнальным белком, имеющим в своей структуре SH3 и SAM домены, отвечающие за межбелковые взаимодействия. Выраженное снижение экспрессии SASH1 описано для многих опухолей. С использованием конфокальной микроскопии нами было проведено иммунофлуоресцентное исследование распределения SASH1 в культурах нормальных эпителиальных клеток IAR-20 и клеток линии колоректального рака HT-29. Нормальные эпителиоциты IAR-20 и эпителиоциты HT-29, имеющие эпителиальный фенотип, образовывали стабильные линейные межклеточные адгезионные контакты (АК), ассоциированные с кольцевыми актиновыми пучками. В этих клетках SASH1 колокализовался с кольцевыми пучками и линейными АК. В ламеллиподиях SASH1 не детектировался. Под воздействием эпидермального фактора роста клетки IAR-20 и HT-29 вступали в эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП). ЭМП в культурах IAR-20 и HT-29 имел существенные различия. Клетки IAR-20 проходили неполный ЭМП, приобретая способность к миграции, но при этом сохраняя E-кадхерин в радиальных нестабильных AK. SASH1 присутствовал в таких контактах. При прохождении ЭМП клетками НТ-29 наблюдалось полное исчезновение AK, что также приводило к разрушению стабильной межклеточной адгезии. SASH1 уходил из зон межклеточного взаимодействия. Супрессия SASH1 посредством RNA-интерференции вызывала разрушение стабильных линейных АК клеток IAR-20. Через 48 ч после трансфекции siRNA SASH1 в культуре отмечалось появление клеток с мезенхимальным фенотипом. Полученные данные указывают на вовлеченность SASH1 в поддержание стабильной межклеточной адгезии.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** SASH1, межклеточная адгезия, Е-кадхерин, эпителиально-мезенхимальный переход. **DOI:** 10.31857/S0320972520060032

### введение

Ген SASH1 был впервые описан при анализе генов, экспрессия которых была значительно снижена в карциномах молочной железы [1]. SASH1 экспрессируется во многих тканях, за исключением дендритных клеток и лимфоцитов, и рассматривается в качестве кандидата в опухолевые супрессоры. Снижение экспрессии SASH1 было обнаружено в 74% образцов рака молочной железы, а также в карциномах легких, щитовидной железы и гепатоцеллюлярных карциномах [1, 2]. Для карцином молочной железы, толстой кишки, яичника и шейки матки SASH1 считается прогностическим маркером, выраженное снижение его экспрессии показано для продвинутых стадий опухолевого роста. В аденомах и карциномах на ранних стадиях экспрессия *SASH1* сохранялась на высоком уровне [1, 3–5].

Белок SASH1 является адаптерным сигнальным белком, он содержит центральную область, включающую NLS домен, ответственный за ядерную локализацию белка, а также два домена SAM (sterile  $\alpha$  module domain) и домен SH3 (Src homology 3 domain), участвующие в межбелковых взаимодействиях [1]. Присутствие в составе молекулы домена SH3 указывает на возможное участие SASH1 в сигналинге и его возможную связь с интегральными мембранными белками, как скаффолдного и адаптерного белка. При оверэкспрессии SASH1 в клетках линий гепатокарциномы и карциномы желудка отмечалось уменьшение экспрессии мезенхимальных маркеров виментина и N-кадхерина, повышение экспрессии Е-кадхерина, снижение клеточной подвижности и инвазивной активности, усиление адгезии клеток к внеклеточному матриксу

Принятые сокращения: АК – межклеточные адгезионные контакты, ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход, EGF – эпидермальный фактор роста.

<sup>\*</sup> Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio. msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM20-082, 01.06.2020.

<sup>\*\*</sup> Адресат для корреспонденции.

[6, 7]. В клетках НСТ116 нокдаун SASH1 с использованием CRISPR-Cas9 приводил к угнетению экспрессии Е-кадхерина, активации экспрессии виментина и транскрипционного фактора эпителиально-мезенхимального перехода ( $\Im M\Pi$ ) — Zeb1. Подавление SASH1 приводило к активации миграционной и инвазивной активности клеток in vitro, а также стимулировало метастатическую активность клеток in vivo при росте в ортотопических ксенотрансплантатах у иммунодефицитных мышей [8]. Было показано, что SASH1 взаимодействует с *N*-концевым SH3 доменом белка CRKL. Предполагается, что CRKL активирует SRC/FAK сигналинг, тем самым активируя ЭМП [9]. Кроме того, белки CRK (CRK II и CRKL) могут рекрутировать факторы обмена нуклеотидов в непосредственной близости от мембраны, тем самым активируя малые ГТФазы Rap1 и Rac1 [10]. Хорошо известно, что малая ГТФаза Rac1 играет центральную роль в клеточной миграции. Активный Rac1 посредством WAVE активирует комплекс ARP2/3, нуклеирующий полимеризацию актиновой сети в ламеллиподиях на ведущем крае клетки [11]. До настоящего времени, несмотря на достаточно большое количество данных о влиянии изменений содержания SASH1 на функциональные характеристики клеток, исследований внутриклеточной локализации SASH1 не проводили. В единственной работе Martini et al. [12] утверждается, что SASH1 аккумулируется в ламеллиподиях и колокализуется с кортактином, который, как известно, связываясь с комплексом Arp2/3, стабилизирует структуру актиновой сети, что способствует эффективной миграции клеток [13].

Появление миграционной активности у эпителиальных клеток является ключевой характеристикой ЭМП – программы, которая играет ведущую роль в эмбриональном развитии и при заживлении ран. Раковые клетки используют программу ЭМП для инициации инвазионнометастатического каскада. Важнейшими звеньями ЭМП являются утрата эпителиоцитами апикально-базальной полярности и стабильной межклеточной адгезии и приобретение миграционного фенотипа [14, 15]. Пусковым механизмом ЭМП считается индукция транскрипционных факторов ЭМП (Snail, Twist, Zeb и др.) и связанное с этим угнетением экспрессии Екадхерина, и ослабление межклеточной адгезии. Недавно мы показали, что разрушение стабильной межклеточной адгезии может быть также обусловлено специфической реорганизацией актинового цитоскелета и замещением стабильных линейных Е-кадхериновых межклеточных адгезионных контактов (АК) нестабильными радиальными [16]. Было обнаружено, что связанные с АК кольцевые актиновые пучки, образованные  $\beta$ -актином [17], разрушаются уже на самых ранних этапах ЭМП, что приводит к перестройке АК и ослаблению межклеточной адгезии. Целью настоящей работы было исследование распределения SASH1 в зонах межклеточного взаимодействия эпителиальных клеток, изучение особенностей его внутриклеточной локализации в ходе ЭМП при разрушении стабильных АК и кольцевых актиновых пучков.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. Линия нормальных иммортализованных эпителиоцитов IAR-20 была выделена из печени крыс в Международном раковом агентстве Монтесано и коллегами [18]. В работе была также использована линия колоректальной аденокарциномы человека HT-29 (ATCC, США).  $1 \times 10^5$  клеток рассевали в чашки Петри с покровными стеклами или в чашки Петри со стеклянным дном («MatTek Corporation», США) и культивировали в модифицированной Дальбекко среде Игла (DMEM) («Sigma», США) с 10%-ной телячьей эмбриональной сывороткой («PAA Laboratories», Австрия) в течение 24 ч. Далее клетки культивировали в среде с 1%-ной телячьей эмбриональной сывороткой в течение 20 ч. Для индукции ЭМП клетки IAR-20 и HT-29 обрабатывали EGF («Sigma», США) в концентрации 40 и 50 нг/мл соответственно, добавляя в культуральную среду из стокового раствора.

Иммунофлуоресцентная микроскопия и DIC видеомикроскопия. Для иммунофлуоресцентного окрашивания были использованы следующие антитела: мышиные моноклональные антитела к Е-кадхерину (клон 36, 1 : 200; «BD Transduction Labs», США), кроличьи антитела к SASH1 (клон 266A, 1:100; «Bethyl Laboratories», США), мышиные моноклональные антитела к  $\beta$ -актину (клон 4C2, 1 : 100; «Merck, Millipore», США,), мышиные моноклональные антитела к кортактину (клон 4F11, 1 : 200; «Sigma», США), а также антитела козы к мышиным IgG1, IgG2a и антитела козы к мышиному и кроличьему IgG, конъюгированные с Alexa Fluor488, Alexa Fluor594 или Alexa Fluor647 (1: 200; «Jackson ImmunoResearch», США). Клетки на стеклах фиксировали 15 мин смесью метанола/ацетона (1/1) при -10 °C, после чего инкубировали с первыми антителами. После промывки фосфатным буфером (1× PBS pH 7,4) инкубировали со вторыми антителами. Препараты исследовали с применением конфокального микроскопа Leica TCS SP5, с использованием объектива HDX PL

APO 63×/1.3 («Leica Microsystems», Швейцария) и эпифлуоресцентного микроскопа Axioplan Zeiss, с использованием объектива Plan-Neofluar 100×/1.3 («Carl Zeiss», Германия). Для получения изображений с помощью DIC видеомикроскопии за 20 мин до визуализации произсмену культуральной водили среды на DMEM/F12 без фенолового красного, с L-глутамином и HEPES с добавлением 1%-ной телячьей эмбриональной сыворотки. Через час после начала съемки в культуральную среду добавляли EGF для индукции ЭМП. Прижизненную микроскопию осуществляли с помощью микроскопа NikonEclipseTi с использованием объектива PlanFluor40× и цифровой камеры ORCA-ER («Hamamatsu Photonics», Япония) и программного обеспечения NIS-Elements AR 3.22 («Nikon», Япония). Частота съемки 1 кадр в мин в течение 6 ч (для клеточной культуры Iar-20) и каждые 10 мин в течение 10 ч (для клеточной культуры НТ-29).

**RNA-интерференция.** Для супрессии SASH1 была использована ON-TARGETplus SMARTpool rat Sash1 siRNA (50 нМ) и в качестве трансфицирующего агента – DharmaFECT1 («Dharmacon», США). GFP siRNA использовали в качестве негативного контроля. Культуры инкубировали 48 ч в среде DMEM с 10%-ной сывороткой. Далее клетки лизировали и анализировали с помощью иммуноблоттинга. Стекла с трансфицированными клетками также фиксировали для иммунофлуоресцентного окрашивания.

Иммуноблоттинг. Клетки лизировали лизисбуфером RIPA (50 мМ Tris-HCl, pH 7,4 («MP Biomedicals», Франция); 150 мМ NaCl («Sigma», США); 2 мМ EDTA («Sigma», США); 1% NP-40 («Fluka», США); 0,1% SDS («AppliChem», Испания) с добавлением 0,25 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 мМ DTT, 10 мМ NaF и коктейля ингибиторов протеаз («Sigma», США). Образцы смешивали с 5× буфером для нанесения (250 мМ Tris-HCl, pH 6,8; 10% SDS, 30% (v/v) глицерин, 5% β-меркаптоэтанол, 0,02% бромфеноловый синий) и инкубировали при 95 °C в течение 10 мин. Далее образцы наносили на 10% SDS-полиакриламидный гель и проводили вертикальный электрофорез согласно протоколу («Bio-Rad», США). Белки после электрофореза переносили с гелей на Amersham Hybond-P PVDF мембраны («GE Healthcare», США). Мембраны блокировали 5%-м раствором молока («Fluka», США) на фосфатном буфере ( $1 \times PBS pH 7.4$ ) с добавлением 0,1% (v/v) Tween-20 («AppliChem», Испания) в течение 1 ч на качалке. Далее мембраны инкубировали с первыми антителами 16 ч при 4 °С. После отмывки фосфатным буфером с добавлением 0.1% (v/v) Tween-20 мембраны инкубировали со вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой, в течение 1 ч при комнатной температуре. Для контроля загрузки использовали моноклональные антитела к общему актину (клон C4, 1 : 1000; «Merck, Millipore», США) Сигнал детектировали с помощью Pierce ECL Western Blotting Substrate («Thermo Fisher Scientific», США), изображения получали с помощью прибора Image Quant LAS 4000 («GE Healthcare», США). Для денситометрии полученных изображений блотов использовали программу ImageJ [imagej.net]. Значения оптической плотности полос SASH1 нормировали на маркерный белок – актин. При статистической обработке результатов трех экспериментов использовали критерий Стьюдента, данные представляли, как средние значения ± ошибка среднего.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С использованием конфокальной микроскопии было проведено исследование распределения SASH1 в нормальных эпителиоцитах линии IAR-20, а также в клетках линии колоректального рака НТ-29. Клетки этих линий имели эпителиальный фенотип и в редкой культуре образовывали островки, а в густой культуре - монослои. Было выполнено тройное иммунофлуоресцентное окрашивание Е-кадхерина, актина и SASH1 (рис. 1, *a*). Как показала конфокальная микроскопия, клетки IAR-20 формировали линейные межклеточные адгезионные контакты, ассоциированные с кольцевыми актиновыми пучками. Такие контакты аккумулировали SASH1. SASH1 также детектировался в зоне краевого актинового пучка. Антитела хорошо выкрашивали SASH1 при фиксации клеток метанолом/ацетоном, которая вместе с тем приводила к неспецифическому свечению вторых антител (рис. 1,  $\delta$ ). Выраженное свечение в цитоплазме при микроскопии клеток в дальнем красном канале конфокального микроскопа не было связано с SASH1 и было обусловлено сорбцией меченных Alexa647 вторичных антител к кроличьему иммуноглобулину на внутриклеточных органеллах. Также в цитоплазме отмечалось неспецифическое свечение вторичных антител к изотипам мышиных иммуноглобулинов, которые использовались для одновременной детекции Е-кадхерина и β-актина. Вместе с тем на периферии клеток неспецифическое свечение вторичных антител не было выражено, что позволило детально исследовать межклеточные границы и зоны клеточного края.



**Рис. 1.** SASH1 в нормальных эпителиальных клетках IAR-20. a – Конфокальная микроскопия: Е-кадхерин (красный канал),  $\beta$ -актин (зеленый канал), SASH1 (дальний красный канал). Флажок указывает на межклеточный контакт, представленный с большим увеличением на врезках. SASH1 аккумулируется в области AK.  $\delta$  – Конфокальная микроскопия. Контроль вторых антител. Неспецифическое свечение вторичных антител. Красный канал – анти-мышиные IgG<sub>2a</sub>, меченные Alexa594, зеленый канал – анти-мышиные IgG, меченные Alexa647. e – Флуоресцентное окрашивание на кортактин, Е-кадхерин и SASH1 присутствует в AK и в зоне краевого актинового пучка. Во врезках – часток клеточной SASH1 не присутствует, стрелка – на аккумуляцию SASH1 в зоне краевого актинового пучка. Во врезках – участок клеточной края при большем увеличении. Масштаб – 10 мкм. (С цветными вариантами рис. 1–4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournal.ru/journal/biokhsm/)

Martini et al. [12] утверждали, что SASH1 детектируется в ламеллиподиях и колокализуется с кортактином, белком, тесно связанным с актиновой сетью. Как показали наши эксперименты, в клетках IAR-20 и HT-29 колокализации кортактина и SASH1 нет. В клетках IAR-20 кортактин присутствовал в актиновой сети ламеллиподий на свободном крае и также колокализовался с краевым актиновым пучком (рис. 1, e), в то время как SASH1 в зонах ламеллиподий отсутствовал. Его распределение на активном крае клеток было ограничено краевым актиновым пучком.

Ранее мы показали, что при обработке эпидермальным фактором роста (EGF) клетки IAR-20 вступают в ЭМП, разрывая стабильные связи друг с другом и приобретая способность к миграции [16] (рис. 2, a).

Клетки IAR-20 в присутствии EGF могут мигрировать как индивидуально, так и в составе

БИОХИМИЯ том 85 вып. 6 2020

группы клеток, они могут устанавливать контакты с соседними клетками, но такие контакты нестабильны. При исследовании ранних этапов ЭМП мы обнаружили, что ослабление межклеточной адгезии у клеток IAR-20 связано не с угнетением экспрессии Е-кадхерина или его аккумуляцией на межклеточных границах, а с разрушением кольцевого актинового пучка, связанного с линейными АК, появлением ламеллиподий на границах между клетками и замещением линейных АК нестабильными радиальными АК, также образованными Е-кадхерином. В связи с этим мы задались вопросом, как меняется распределение SASH1 в клетках IAR-20, вступивших в ЭМП. Оказалось, что параллельно с реорганизацией АК также изменялась и локализация SASH1 в зонах межклеточного взаимодействия. Как показала конфокальная микроскопия, в ламеллиподиях, образующихся как на свободном клеточном крае, так и на межклеточных грани-

## ИЛЬНИЦКАЯ и др.



**Рис. 2.** Эпителиоциты IAR-20 в присутствии EGF. a - DIC видеомикроскопия. До добавления EGF клетки IAR-20 образуют островки. После добавления EGF (0 мин) клетки вступают в ЭМП: индуцируется протрузионная активность, разрушаются межклеточные контакты, активируется клеточная миграция. При миграции клетки могут формировать контакты с соседними клетками. Такие контакты нестабильны. Флажки – зоны разрыва межклеточных контактов, стрелки – вновь образованные контакты.  $\delta$ ,  $e - \Phi$ луоресцентное окрашивание клеток IAR-20 на  $\beta$ -актин, E-кадхерин, SASH1.  $\delta - 10$  мин инкубации с EGF. Появление ламеллиподий на межклеточных границах. SASH1 не детектируется в ламеллиподиях. e - 30 мин инкубации с EGF. SASH1 присутствует в радиальных E-кадхерин-содержащих AK. Флажки указывают на межклеточные границы, представленные с большим увеличением на врезках. Масштаб – 10 мкм

цах, SASH1 отсутствовал, при этом во вновь образованных радиальных AK SASH1 детектировался (рис. 2,  $\delta$  и  $\theta$ ).

Исследование было продолжено на клетках линии колоректальной аденокарциномы HT-29. Клетки HT-29 имеют эпителиальный фенотип и формируют стабильные линейные AK, которые образованы Е-кадхерином (рис. 3, *a*). Такие контакты ассоциированы с кольцевым актиновым пучком. SASH1 аккумулировался в области линейных AK клеток HT-29. Клетки HT-29 под действием EGF также вступали в ЭМП. В отличие от эпителиоцитов IAR-20, клетки HT-29 проходили полный ЭМП, они теряли связи друг с другом и по субстрату мигрировали индивидуально (рис. 3,  $\delta$ ). Иммунофлуоресцентное окрашивание показало полное разрушение AK у клеток HT-29, обработанных EGF. Е-кадхерин ухо-

дил из контактов и обнаруживался в эндосомах, из зон межклеточного взаимодействия параллельно разрушению AK уходил и SASH1. В некоторых клетках, для которых была характерна аккумуляция актиновых филаментов на клеточном крае, SASH1 также аккумулировался в этой зоне в виде тонкой линии (рис. 3, *в*).

Полученные данные указывают на то, что SASH1 присутствует в AK, и это свидетельствует о его возможном участии в функционировании AK. Мы решили выяснить, как влияет супрессия SASH1 на морфологию клеток и межклеточную адгезию. Для этого мы использовали ON-TARGETplus SMARTpool rat SASH1 siRNA (рис. 4, a,  $\delta$ ). Как показало иммунофлуоресцентное исследование, супрессия SASH1 в клетках IAR-20 оказывала значительное влияние на структуры межклеточной адгезии. Через 48 ч после трансфекции SASH1 siRNA стабильные линейные E-кадхериновые AK, характерные для эпителиоцитов IAR-20, разрушались. На межклеточных границах были видны отдельные точечные или короткие радиальные AK (рис. 4, a). В цитоплазме были видны эндосомы, заполненные E-кадхерином. Островки клеток часто распадались, в культуре было много клеток, кото-



**Рис. 3.** SASH1 в клетках карциномы HT-29.  $a - \Phi$ луоресцентное окрашивание контрольной культуры на Е-кадхерин, β-актин и SASH1. Конфокальная микроскопия. Клетки образуют линейные AK, ассоциированные с кольцевыми актиновыми пучками. SASH1 аккумулируется в области AK. Масштаб – 10 мкм.  $\delta$ , e - Индукция ЭМП под действием EGF. $<math>\delta - DIC$  видеомикроскопия. До добавления EGF клетки HT-29 образуют островки. Под действием EGF клетки проходят ЭМП: разрушается стабильная межклеточная адгезия, индуцируется миграционная активность. Цифрами отмечено положение клеток. Масштаб – 50 мкм. e - 8-часовая инкубация с EGF. Флуоресцентное окрашивание на Е-кадхерин,  $\beta$ -актин и SASH1. Полное разрушение AK и эндоцитоз Е-кадхерина, разрушение стабильной межклеточной адгезии. SASH1 уходит из AK, но присутствует на свободном крае клеток. Масштаб – 10 мкм



**Puc. 4.** Супрессия SASH1 в клетках культуры IAR-20. a -Иммуноблоттинг культуры через 48 ч после трансфекции SASH1 siRNA. Окрашивание полноразмерной мембраны на SASH1 и на общий актин. I -GFP siRNA (негативный контроль), 2 -контрольная культура, 3, 4 -SASH1 siRNA.  $\delta -$ Денситометрический анализ блотов из трех экспериментов. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01. I -GFP siRNA (негативный контроль), 2 -контрольная культура (негативный контроль), 2 -контрольная культура, 3 -SASH1 siRNA. e, c -Флуоресцентное окрашивание культуры через 48 ч после трансфекции SASH1 siRNA. e -Эпифлуоресцентная микроскопия E-кадхерина и SASH1. На межклеточных границах E-кадхерин аккумулируется в редких точечных AK. Эндосомы содержат E-кадхерин (стрелки). c -Конфокальная микроскопия E-кадхерина,  $\beta$ -актина, SASH1. Клетки приобрели мезенхимальный фенотип. Масштаб – 10 мкм

рые утратили эпителиальную форму и приобрели мезенхимальный фенотип (рис. 4, *г*). Таким образом, оказалось, что уменьшение содержания SASH1 в клетках снижает стабильность межклеточной адгезии, что влияет на морфологию клеток и может приводить к появлению у клеток миграционного фенотипа.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, мы впервые показали, что SASH1 участвует в поддержании межклеточной адгезии. В наших экспериментах супрессия SASH1 посредством RNA-интерференции приводила к разрушению стабильных Е-кадхериновых АК и сдвигала фенотип эпителиальных клеток в сторону мезенхимального. Эти данные согласуются с данными Franke et al. [8], описавших индукцию ЭМП у клеток гепатокарциномы при выключении SASH1 посредством CRISPR-Cas9. Ранее с использованием дрожжевого двугибридного скрининга было показано взаимодействие SASH1 с активным Rac1 [19], и на основании этого можно было бы считать SASH1 эффектором Rac1. Вместе с тем данные о вовлеченности Rac1 в формирование АК противоречивы. С одной стороны, считается, что активный Rac1 стабилизирует АК, рекрутируя актин к гомофильно связанным Е-кадхериновым рецепторам [20]. С другой стороны, известно, что активность Rac1 детектируется в зонах межклеточного взаимодействия только на самых ранних этапах формирования стабильных АК – при взаимодействии ламеллиподий и существенно снижается по мере расширения и созревания линейного АК [21]. Недавно мы показали, что в клетках IAR-20 на ранних этапах ЭМП разрушение кольцевого актинового пучка и замещение стабильных АК нестабильными радиальными АК сопровождается полимеризацией Arp2/3-зависимой актиновой сети и появлением ламеллиподий в зонах межклеточного взаимодействия, то есть активацией Rac [16]. Мы считаем, что Rac, скорее всего, не участвует в поддержании стабильности АК. Его активация при воздействии ростовых факторов, напротив, индуцирует образование ламеллиподий на межклеточных границах, что приводит к утрате контактного паралича и дестабилизации межклеточной

адгезии. На основании полученных нами данных, мы предполагаем, что SASH1, возможно, не является эффектором Rac-GTP, но является его негативным регулятором на межклеточных границах, стабилизируя адгезию между клетками. Ранее было показано, что SASH1 взаимодействует с *N*-концевым SH3 доменом белка CRKL и активирует SRC/FAK онкогенный сигналинг [9]. С другой стороны, имеются данные о том, что оверэкспрессия СRК белков (CRK II и CRKL) вызывает активацию Rac, образование ламеллиподий на свободном клеточном крае, разрушение АК и скэттеринг эпителиальных островков [22]. Возможно, в зонах межклеточных контактов SASH1, как скаффолд-белок, связывая белок CRKL и активный Rac или факторы обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF) Rac, приводит к угнетению его активности, что стабилизирует АК. Супрессия SASH1 высвобождает онкогенную активность CRKL, что способствует активации Rac и приводит к разрушению межклеточной адгезии. Подтверждение высказанной нами гипотезы, очевидно, требует дальнейшей экспериментальной проверки.

Следует также отметить, что SASH1, локализуясь на межклеточных границах и имея в структуре NLS последовательность для транспортировки в ядро, может быть связан с контактным торможением пролиферации, характерным для

нормальных эпителиальных клеток. Подобная регуляторная функция описана, в частности, для многофункционального белка мерлина, который не только ассоциирован с кольцевым актиновым пучком и АК, но также негативно регулирует EGFR и Rac/PAK сигналинг и способствует переходу из ядра в цитоплазму транскрипционных коактиваторов YAP/TAZ при высокой плотности эпителиального монослоя [23]. Возможно, SASH1 является тем ключевым игроком, чья способность формировать комплексы с многими белками на мембране и в ядре может обеспечивать его значимую роль в опухолевой супрессии, связывая воедино негативное влияние на миграционную и пролиферативную активность клеток.

Финансирование. Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 18-54-16005). Работа по изучению ЭМП поддержана Российским научным фондом (грант № 16-15-10288).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zeller, C., Hinzmann, B., Seitz, S., Prokoph, H., 1. Burkhard-Goettges, E., Fischer, J., Jandrig, В., Schwarz, L.-E., Rosenthal, A., and Scherneck, S. (2003) SASH1: a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q24.3 is downregulated in breast cancer, Oncogene, 22, 2972-2983, doi: 10.1038/sj.onc.1206474.
- 2 Peng, L., Wei, H., and Liren, L. (2014) Promoter methylation assay of SASH1 gene in hepatocellular carcinoma, J. BUON, 19, 1041-1047.
- Rimkus, C., Martini, M., Friederichs, J., Rosenberg, R., 3. Doll, D., Siewert, J. R., Holzmann, B., and Janssen, K. P. (2006) Prognostic significance of downregulated expression of the candidate tumour suppressor gene SASH1 in colon cancer, Br. J. Cancer, 95, 1419-1423, doi: 10.1038/ sj.bjc.6603452
- Ren, X., Liu, Y., Tao, Y., Zhu, G., Pei, M., Zhang, J., and 4. Liu, J. (2016) Downregulation of SASH1 correlates with tumor progression and poor prognosis in ovarian carcinoma, Oncol. Lett., 11, 3123-3130, doi: 10.3892/ol.2016.4345.
- Xie, J., Zhang, W., Zhang, J., and Luan, Y.-F. (2017) Down-5. regulation of SASH1 correlates with poor prognosis in cervical cancer, Eur. Rev. Med. Pharm. Sci., 21, 3781-3786.
- 6. He, P., Zhang, H., Sun, C., Chen, C., and Jiang, H. (2016) Overexpression of SASH1 Inhibits the proliferation, invasion, and EMT in hepatocarcinoma cells, Oncol. Res., 24, 25-32, doi: 10.3727/096504016X14575597858609.
- Zong, W., Yu, C., Wang, P., and Dong, L. (2016) Overexpression of SASH1 inhibits TGF-b1-induced EMT 7. in gastric cancer cells, Oncol. Res., 24, 17-23, doi: 10.3727/ 096504016X14570992647203.

Franke, F. C., Müller, J., Abal, M., Medina, E. D., Nitsche, U., Weidmann, H., Chardonnet, S., Ninio, E., and Janssen, K. P. (2018) The tumor suppressor SASH1 interacts with the signal adaptor CRKL to inhibit epithelial-mesenchymal transition and metastasis in colorectal cancer, Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol., 7, 33-53, doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.08.007.

- 9 Franke, F. C., Slusarenko, B. O., Engleitner, T., Johannes, W., Laschinger, M., Rad, R., Nitsche, U., and Janssen, K. P. (2020) Novel role for CRK adaptor proteins as essential components of SRC/FAK signaling for epithelial-mesenchymal transition and colorectal cancer aggressiveness, Int. J. Cancer, 146, doi: 10.1002/ijc.32955.
- Feller, S. (2001) Crk family adaptors signalling complex 10 formation and biological roles, Oncogene, 20, 6348-6371, doi: 10.1038/sj.onc.1204779.
- 11. Krause, M., and Gautreau, A. (2014) Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 15, 577-590, doi: 10.1038/nrm3861.
- Martini, M., Gnann, A., Scheikl, D., Holzmann, B., and Janssen, K. P. (2011) The candidate tumor suppressor 12. SASH1 interacts with the actin cytoskeleton and stimulates cell-matrix adhesion, Int. J. Biochem. Cell. Biol., 43, 1630-1640, doi: 10.1016/j.biocel.2011.07.012.
- 13. Rottner, K., and Stradal, T. (2016) How distinct Arp2/3 complex variants regulate actin filament assembly, Nat. Cell Biol., 18, 1-3, doi: 10.1038/ncb3293.
- Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014) Mole-14. cular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition,

*Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 178-196, doi: 10.1038/nrm3758.

- Nieto, M. A., Huang, R. Y., Jackson, R. A., and Thiery, J. P. (2016) EMT: 2016, *Cell*, **166**, 21-45, doi: 10.1016/j.cell. 2016.06.028.
- Zhitnyak, I. Y., Rubtsova, S. N., Litovka, N. I., and Gloushankova, N. A. (2020) Early events in actin cytoskeleton dynamics and E-cadherin-mediated cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, *Cells*, 9, pii: E578, doi: 10.3390/cells9030578.
- Dugina, V., Zwaenepoel, I., Gabbiani, G., Clément, S., and Chaponnier, C. (2009) β- and γ-Cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity, *J. Cell Sci.*, **122**, 2980-2988, doi: 10.1242/jcs.041970.
- Montesano, R., Saint Vincent, L., Drevon, C., and Tomatis, L. (1975) Production of epithelial and mesenchymal tumors with rat liver cells transformed *in vitro*, *Int. J. Cancer*, 16, 550-558, doi: 10.1002/ijc.2910160405.
- Ломакина М. Е., Полесская А., Александрова А. Ю., Готро А. (2016) Поиск новых регуляторов клеточного

движения среди недавно обнаруженных партнеров связывания ГТФазы Rac, *Успехи молекулярной онколо*сии, **3**, 20.

- McCormack, J., Welsh, N. J., and Braga, V. M. (2013) Cycling around cell-cell adhesion with Rho GTPase regulators, J. Cell Sci., 126, 379-391, doi: 10.1242/jcs.097923.
- 21. Yamada, S., and Nelson, W. J. (2007) Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion, *J. Cell Biol.*, **178**, 517-527, doi: 10.1083/jcb.200701058.
- Lamorte, L., Royal, I., Naujokas, M., and Park, M. (2002) Crk adapter proteins promote an epithelial-mesenchymallike transition and are required for HGF-mediated cell spreading and breakdown of epithelial adherens junctions, *Mol. Biol. Cell*, 13, 1449-1461, doi: 10.1091/mbc.01-10-0477.
- Furukawa, K. T., Yamashita, K., Sakurai, N., and Ohno, S. (2017) The epithelial circumferential actin belt regulates YAP/TAZ through nucleocytoplasmic shuttling of merlin, *Cell Rep.*, 20, 1435-1447, doi: 10.1016/j.celrep. 2017.07.032.

## INVOLVEMENT OF SASH1 IN THE MAINTENANCE OF STABLE CELL–CELL ADHESION\*

### A. S. Ilnitskaya, I. Y. Zhitnyak, and N. A. Gloushankova\*\*

Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478 Moscow, Russia; E-mail: natglu@hotmail.com

> Received April 1, 2020 Revised April 29, 2020 Accepted May 3, 2020

SASH1 is an adapter and signaling protein that contains SH3 and SAM domains responsible for protein—protein interactions. SASH1 downregulation has been observed in many tumors. We examined localization of SASH1 in cultures of normal IAR-20 epithelial cells and HT-29 colorectal cancer cells using immunofluorescence staining and confocal microscopy. IAR-20 normal epithelial cells and HT-29 cells with epithelial phenotype formed stable linear adherens junctions (AJs) associated with circumferential actin bundles. In both IAR-20 and HT-29 cells, SASH1 was co-localized with zones of circumferential actin bundles and linear AJs. SASH1 was not detected in lamellipodia. IAR-20 and HT-29 cells treated with Epidermal Growth Factor underwent epithelial-mesenchymal transition (EMT). We observed significant differences in the course of EMT between IAR-20 and HT-29 cultures. IAR-20 cells underwent partial EMT acquiring migratory phenotype but retaining E-cadherin in unstable radial AJs. SASH1 was present in these contacts. Disappearance of AJs was observed in HT-29 cell undergoing a complete EMT, which also resulted in disruption of stable cell–cell adhesion. SASH1 was lost from the zones of cell–cell interaction. SASH1 depletion by means of RNA interference in IAR-20 cells led to destruction of stable linear AJs and acquisition of mesenchymal phenotype by some of the cells. These data indicate involvement of SASH1 in the maintenance of stable cell–cell adhesion.

Keywords: SASH1, cell-cell adhesion, E-cadherin, epithelial-mesenchymal transition