

ВЫЯСНЕНИЕ РОЛИ АДАПТЕРНОГО БЕЛКА Anks1a В РЕГУЛЯЦИИ ПОДВИЖНОСТИ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2022 А.О. Жолудева¹, М.Е. Ломакина^{1,2}, Е.А. Орлова¹, Я. Ванг², А. Фокин²,
А. Полесская², А.М. Готро², А.Ю. Александрова^{1*}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, 115478 Москва, Россия; электронная почта: tonya_alex@yahoo.com

² Национальный центр научных исследований Франции, Политехническая школа,
Парижский политехнический институт, 91120 Палезо, Франция

Поступила в редакцию 20.09.2022

После доработки 30.10.2022

Принята к публикации 31.10.2022

Критическим этапом опухолевой прогрессии является эпителиально-мезенхимальный переход, в результате которого опухолевые клетки (ОК) приобретают способность к мезенхимальной миграции, основным регулятором которой является сигнальный путь Ras→WAVE→Arp2/3. Ранее было показано, что белки, взаимодействующие с Ras, могут регулировать мезенхимальную миграцию и влиять на эффективность метастазирования. Поиск новых регуляторов миграции является актуальной теоретической и практической задачей. Одним из белков, взаимодействующих с Ras, является адаптерный белок Anks1a, изменение экспрессии которого показано для многих опухолей. Задачей исследования было выяснение вопроса, влияет ли Anks1a на подвижность ОК и каков механизм его действия. Предполагается, что Anks1a может оказывать влияние на миграцию ОК либо как эффектор Ras1, либо за счет усиления интенсивности обмена рецепторов к эпидермальному фактору роста HER2. Был исследован эффект усиления и подавления экспрессии Anks1a на миграцию клеток рака молочной железы (МЖ) с разным статусом HER2. Показано, что Anks1a взаимодействует с активированной формой Ras1. В линии MDA-MB-231 (тройной негативный рак), в которой отсутствуют HER2, Anks1a накапливается на активном крае клетки, для которого характерно обогащение активным Ras1. Тогда как у клеток SK-BR-3 (HER2 оверэкспрессирован) не наблюдалось концентрации Anks1a на активном крае. Подавление экспрессии Anks1a практически не влияет на подвижность ОК, лишь немного увеличивается скорость миграции у MDA-MB-231. Оверэкспрессия Anks1a приводит к увеличению скорости движения лишь у клеток SK-BR-3, т.е. оказывает влияние на миграцию только в том случае, когда есть оверэкспрессия HER2. Мы показали, что Anks1a является эффектором активированного Ras1, но его влияние в этом качестве на исследованные нами клетки МЖ минимально. Anks1a может оказывать влияние на подвижность клеток МЖ благодаря его участию в механизме обмена рецепторов к EGF.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Anks1a, клеточная подвижность, рак молочной железы, метастазирование.

DOI: 10.31857/S0320972522120193, **EDN:** NIPAVU

ВВЕДЕНИЕ

Приобретение клетками подвижного мезенхимального фенотипа в процессе роста злокачественной опухоли является следствием эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) и одним из ключевых событий, ведущих к образованию метастазов [1]. Поиск новых подходов, позволяющих остановить ми-

грацию опухолевых клеток и, следовательно, метастазирование – это важнейшая задача, на решение которой направлены работы многих лабораторий. Известно, что в основе клеточного движения лежат перестройки актинового цитоскелета [2], однако попытки остановить миграцию опухолевых клеток с помощью прямого разрушения актиновых филаментов или ингибирования их перестроек оказались

Принятые сокращения: МЖ – молочная железа; ОК – опухолевые клетки; РТК – рецептор тирозин киназы; Anks1a – белок, содержащий анкириновый повтор и стерильный альфа-мотив 1A; EGF – эпидермальный фактор роста; HER2 – рецептор 2 эпидермального фактора роста человека.

* Адресат для корреспонденции.

невозможными из-за очень большой токсичности подобных агентов [3]. Поэтому представляется целесообразным искать более тонкие регуляторы, влияющие на процессы клеточной миграции. Важными регуляторами перестроек актинового цитоскелета и клеточной подвижности являются малые ГТФазы семейства Rho – Cdc42, Rac и Rho [4, 5]. При этом каждая из этих ГТФаз выполняет строго определенные функции, они также взаимно регулируют друг друга. Так, Cdc42 отвечает за формирование филоподий, RhoA способствует росту сократимости, образованию и сокращению актиновых пучков и формированию специфических протрузий – бляшек, являющихся основой амебоидной миграции опухолевых и стволовых клеток [6, 7]. Формирование клеточных протрузий, обеспечивающих мезенхимальную миграцию клеток, – ламеллиподий и филоподий – регулируется сигнальным каскадом Rac→WAVE→Arp2/3, который отвечает за Arp2/3-зависимую полимеризацию актиновых филаментов. Активность многих белков, вовлеченных в этот каскад, изменяется при развитии злокачественных опухолей [8–9]. Было показано, что даже незначительные изменения общей активности Rac оказывают влияние на характер миграции клеток, в частности, регулируют направленность движения клеток разных типов [10]. Значение регуляторного пути Rac1 в опухолевой прогрессии было показано в недавно опубликованной работе, прямо иллюстрирующей вовлечение Rac1 в процесс ЭМП и регуляцию метастазирования [11]. Увеличение экспрессии белка WAVE2, регулирующего активность комплекса Arp2/3, коррелирует с возрастанием риска метастазирования при различных типах опухолей [12–13], а подавление такой экспрессии с помощью РНК-интерференции приводит к существенному снижению метастатической активности клеток рака поджелудочной железы [14–15] и высоко метастазирующих клеток рака молочной железы MDA-MB-231 [14]. Усиление экспрессии кофилина, отвечающего за возобновление пула глобулярного актина, необходимого для дальнейшей полимеризации [16], наблюдается во многих опухолях (в глиомах, при раке легких, раке яичников, плоскоклеточном раке полости рта и др.) [17–18]. Оверэкспрессия регулятора активности кофилина, LIM-киназы 1, отмечена в метастазирующих опухолях молочной железы (МЖ) и простаты [19–20]. Несмотря на огромный интерес к изучению внутриклеточных механизмов, регулирующих движение клеток, многие вопросы исследованы недостаточно, в частности, в последнее время были

открыты новые регуляторы процессов полимеризации актина. Описание таких ранее неизвестных участников процесса представляет отдельный интерес, потому что именно они могут быть использованы в качестве мишеней для разработки противоопухолевых агентов, останавливающих метастазирование. Изменение их экспрессии также может служить полезным прогностическим фактором при выборе стратегии лечения и оценке прогнозов данного конкретного пациента. С целью выявления новых возможных регуляторов клеточной миграции был проведен поиск новых ранее неизвестных эффекторов Rac, и среди прочих белков функция эффектора Rac была показана для белка Anks1a.

Anks1a (Ankyrin Repeat and Sterile Alpha Motif Domain Containing 1A), (другое название – ODIN) – белок, относящийся к семейству Anks1, в состав которого входит всего два белка Anks1a и Anks1b. По своей структуре Anks1a является адаптерным белком, который обеспечивает связь тирозинкиназных рецепторов (РТК) типа EGFR, PDGFR и EphA8, с их эффекторами [21–22]. РТК являются ключевыми регуляторами многих сигнальных путей в клетках, и нарушение их функционирования связано с развитием многих типов опухолей [23–24]. Anks1a активно экспрессируется в клетках млекопитающих, в нервных клетках его экспрессия характерна для эмбриональных клеток мозга мыши, но подавлена в клетках взрослого мозга мыши [25]. Недавнее исследование большой когорты пациентов с немелкоклеточным раком легких на поздних стадиях выявило ANKS1A в числе 17 генов, однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphisms, SNP) в которых ассоциирован с плохим прогнозом болезни [26]. Подавление экспрессии Anks1a с помощью shRNA в клетках колоректального рака (СТ26 – клетки, полученные из карциномы толстой кишки) и в клетках, полученных из первичных опухолей MMTV-Neu мышей, приводило к снижению способности этих клеток формировать колонии в мягком агаре и к подавлению образования опухолей при перевивке у мышей. Согласно данным Lee et al. [27], подавление Anks1a в клетках карциномы молочной железы SK-BR-3 также приводило к снижению способности этих клеток к образованию колоний в мягком агаре.

Основным механизмом, посредством которого Anks1a участвует в регуляции развития злокачественных новообразований, считается его участие в обмене РТК и вовлечение в сигналинг EphA2/ErbB2. На клетках НЕК293 и на линии клеток немелкоклеточного рака легко-

го RVH6849 было показано, что усиленная экспрессия Anks1a приводит к усилению циркуляции EGFR, а подавление экспрессии Anks1a приводит к увеличению скорости деградации EGFR в лизосомах [28]. На основании этих и других данных предложена модель, согласно которой Anks1a выступает как регулятор сигнальных путей, активируемых ростовыми факторами [21, 29].

Играет ли какую-нибудь роль в определении характера миграции и пролиферации опухолевых клеток функция Anks1a в качестве эффектора ГТФазы Ras, остается неизвестным.

Нас интересовало, как влияет изменение экспрессии Anks1a на миграцию клеток опухоли МЖ человека и зависит ли это влияние от статуса рецепторов к EGF в этих клетках. Поэтому мы исследовали эффекты усиления и подавления экспрессии Anks1a на линиях клеток рака молочной железы с разным статусом рецепторов к эпидермальному фактору роста 2 (HER2, human epidermal growth factor receptor-2). Так, линия клеток SK-BR-3 обладает повышенным содержанием HER2, а клетки MDA-MB-231 (тройной негативный рак МЖ) характеризуются отсутствием экспрессии HER2. В качестве контроля мы использовали клетки условно-нормального эпителия молочной железы MCF-10A.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. Были использованы следующие клеточные линии: MCF-10A — условно нормальные эпителиальные клетки молочной железы человека с нормальной экспрессией HER2, а также их производная — MCF-10A RacQL, для которой характерна экспрессия конститутивно активного Ras (обе линии получены из лаборатории биохимии Политехнической школы, Палезо, Франция), и две клеточные линии аденокарцином МЖ человека — SK-BR-3 («ATCC», США) с амплификацией *HER2/neu* и MDA-MB-231 («ATCC»), относящаяся к тройному негативному типу рака, т.е. не содержащая прогестеронового и эстрогенового рецепторов и не экспрессирующая HER2. Клетки MCF-10A и MCF-10A RacQL культивировали в среде DMEM/F12 («Sigma», США) с добавлением 5% лошадиной сыворотки (Horse Serum, «PAA Laboratories» Австрия), 10 мкг/мл инсулина, 100 нг/мл холерного токсина (Cholera Toxin), 0,5 мкг/мл гидрокортизона и 20 нг/мл EGF («Sigma», США), а также 32,5 мкг/мл NaHCO₃ и антибиотиков (по 100 ед./мл пенициллина и стрептомицина) («ПанЭко», Россия) при 37 °С

во влажной атмосфере в присутствии 5% CO₂. Клеточные линии аденокарцином культивировали в среде DMEM («Sigma», США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка («PAA Laboratories») и антибиотиков (по 100 ед./мл пенициллина и стрептомицина), при 37 °С во влажной атмосфере в присутствии 5% CO₂.

Трансфекция плазмидами. Для получения клеток с оверэкспрессией Anks1a проводили трансфекцию клеток линий MCF-10A, SK-BR-3 и MDA-MB-231 плазмидами. За 24 ч до трансфекции клетки пересевали на чашки Петри в полную среду DMEM/F12 в присутствии 5% лошадиной сыворотки и других добавок (см. выше) без антибиотиков, так чтобы к моменту трансфекции клетки образовывали субмонослой. В качестве контрольной плазмиды мы использовали MXS AAVS1L SA2A PurobGHpA EF1Flag GFP Blue SV40pA AAVS1R (1929c), собранную при помощи MXS-клонирования в лаборатории А. Готро [30, 31]. В качестве плазмид, трансфекция которых приводила к оверэкспрессии исследуемого белка, мы использовали два варианта: плазмиды, содержащие последовательности мышиного (1929m) и человеческого (1929h) *ANKS1A*. Для создания плазмиды 1929m кодирующая последовательность *ANKS1A* мыши, любезно предоставленная нам доктором С. Север (Центральная больница штата Массачусетс, Отделение нефрологии, США) [27], была амплифицирована из кДНК (BC050847), полученной при помощи обратной транскрипции из тотальной РНК клеток мыши, а затем клонирована нами по сайтам эндонуклеаз рестрикции FseI и AseI в плазмиду 1929c, вместо бактериального репортера Blue. Кроме того, из кДНК *ANKS1A* (NP_056060), полученной посредством обратной транскрипции из тотальной РНК клеток человека линии MCF-10A при помощи набора NucleoSpin RNA Plus Kit («Macherey-Nagel», Франция), мы выделили мРНК *ANKS1A-ΔC* с отсутствующим участком длиной 60 нуклеотидов на С-конце. Для создания плазмиды 1929h эта кодирующая последовательность была амплифицирована по частям с использованием следующих пар праймеров: прямой — 5'-CCCGGAGACGGAAAGTTTGG-3' и обратный — 5'-GAGGTAGCCCACTCTCTTGC-3'; прямой — 5'-AGCTGGAGGAGACGGGTG-3' и обратный — 5'-GTCTTCAGAGCTGCAGGTGA-3'. Затем последовательность *ANKS1A-ΔC* была отсеквенирована на соответствие мРНК *ANKS1A* (NM_015245) и клонирована в вышеописанную плазмиду 1929c по сайтам FseI и AseI.

Изготовление праймеров и секвенирование проводилось компанией «Eurofins Genomics» (Эберсберг, Германия).

Временную трансфекцию клеток плазмидами проводили с использованием Lipofectamine LTX («Invitrogen», США), согласно протоколу производителя. Спустя сутки инкубации при 37 °С во влажной атмосфере в присутствии 5% CO₂ каждую чашку рассаживали на 3 эксперимента: одну чашку со стеклами для дальнейшего иммунофлуоресцентного окрашивания, другую – для анализа методом Вестерн-блот; и в 4-луночную μ-слайд-камеру («Ibidi», Дания) для съемки на видеомикроскопе.

РНК-интерференция. Для подавления экспрессии исследуемого белка Anks1a использовали малые интерферирующие РНК, подготовленные эндорибонуклеазой, нацеленные на человеческий ген *ANKS1A* (human Anks1a esiRNA, esiAnks1a) («Sigma», Германия); Esi egfr (esiGFP) («Sigma», Германия) в концентрации 320 нМ, использовали в качестве негативного контроля. Для трансфекции использовали Lipofectamine RNAi MAX Reagent («Invitrogen», США) в концентрации, рекомендованной производителем. Спустя сутки инкубации при 37 °С во влажной атмосфере в присутствии 5% CO₂ каждую чашку рассаживали на две в полную среду, добавляя в одну из чашек ростовой фактор EGF; еще через сутки чашки рассаживали для дальнейшего иммунофлуоресцентного окрашивания, анализа методом Вестерн-блот; и в 4-луночную μ-слайд-камеру («Ibidi», Дания) для видеомикроскопии.

Флуоресцентная микроскопия. Для последующего проведения флуоресцентного окрашивания и выявления внутриклеточной локализации Anks1a, актина и клеточных ядер применяли фиксацию 3,7%-ным параформальдегидом (PFA). В качестве первичных антител использовали поликлональные кроличьи антитела к белку Anks1a («Bethyl Laboratories, Inc», США). В качестве вторичных антител использовали анти-кроличьи антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой (Alexa 594) («Jackson Immuno Research», США). Актиновые филаменты выявляли при помощи фаллоидина с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488 («Molecular Probes», США), а ядра окрашивали красителем DAPI («Sigma-Aldrich», США). При окрашивании антитела использовали в разведениях, рекомендованных производителями. Препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse-Ti («Nikon», Япония).

Измерение интенсивности флуоресценции. Для построения профилей флуоресценции

на изображениях с иммунофлуоресценцией F-актина и Anks1a использовали программу Fiji/ImageJ. Для этого строили прямую линию длиной 20 мкм (400 пикселей) перпендикулярно активному краю клетки так, чтобы центр прямой находился на краю клетки. График построили по средним значениям 25 профилей (25 разных зон на активном крае) на клетках из трех независимых экспериментов.

Видеомикроскопия. Через 24 ч после перенесения клеток в 4-луночную μ-слайд-камеру среду меняли на бесцветную DMEM/F12 со всеми добавками и с 15 mM HEPES. Для работы мы использовали дифференциальную интерференционно-контрастную (DIC) микроскопию на микроскопе Nikon Eclipse-Ti с объективом Plan Fluor 20×. Видеосъемку проводили в режиме Time-Lapse в течение 10 ч с межкадровым интервалом 5 мин, при температуре 37 °С при помощи цифровой камеры с охлаждением ORCA-ER («Hamamatsu Photonics», Япония), используя программное обеспечение NIS-Elements AR 3.22 software («Nikon»).

Анализ миграционной способности клеток. Для определения траекторий и скорости движения исследуемых клеток в культуре мы строили треки движения клеток на последовательностях видеок кадров в программе ImageJ. Подсчет средних скоростей клеток на основании построенных треков был проведен в программе MS Excel при помощи макросов Speed, Plot_at_Origin и Dir_Ratio [32]. Для каждой клеточной линии были получены данные по трем опытам, оценивалось в среднем около 20 полей зрения в каждом опыте. Подвижными считали клетки, которые смещались на расстояние больше своего радиуса.

Приготовление белковых лизатов. Трансфицированные и контрольные клетки, рассаживаемые на чашки Петри промывали холодным фосфатным буфером (1× PBS, pH 7,4) и лизировали в буфере RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7,4 («MP Biomedicals», Франция); 150 mM NaCl («Sigma», США); 2 mM EDTA («Sigma», США); 1% NP-40 («Fluka», США); 0,1% SDS («AppliChem», Испания)) с добавлением коктейля ингибиторов протеаз («Roche», Германия) в течение 20–30 мин на льду. После инкубации лизаты центрифугировали при 19 721 g в течение 30 мин. Отбирали супернатант (лизат) в новые пробирки и измеряли концентрацию белка методом Бредфорда, после чего лизаты хранили при –20 °С.

Анализ GST pull-down. Клетки MCF-10A лизировали в буфере XB-NP-40 (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 1% NP-40, 10 mM EDTA, pH 7,7) с добавлением протеазного ингибитора в

течение 30 мин при 4 °С, после чего центрифугировали при 19 721 g 15 мин. 20 мкг очищенных GST-белков инкубировали с 20 мкл гранул глутатион-сефарозы («GE Healthcare», США) в 500 мкл буфера (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 1% (w/v) Triton X-100, 5% (v/v) глицерина, 1 mM DTT, pH 8,0) при 4 °С в течение 1 ч. Гранулы глутатион-сефарозы отмывали и инкубировали в 1 мл клеточного экстракта MCF-10A 1 ч при 4 °С. Затем отмывали буфером XB-NP-40 и исследовали состав иммунопреципитата методом Вестерн-блота.

Вестерн-блот. Данный метод использовали для качественного и количественного анализа экспрессируемого клетками белка Anks1a, для оценки эффективности проведенной трансфекции, а также для анализа содержания иммунопреципитата. Нормализованные по концентрации белка образцы клеточных лизатов смешивали с 5× буфером для нанесения (250 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% SDS, 30% (v/v) глицерин, 5% β-меркапто-этанол, 0,02% бромфеноловый синий) и инкубировали при 95 °С в течение 10 мин. Далее образцы наносили на 7,5%-ный 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»). Мембраны блокировали 5%-ным раствором молока («Fluka», США) на фосфатном буфере (1× PBS, pH 7,4) с добавлением 0,1% (v/v) Tween-20 («AppliChem», Испания) в течение 1 ч на качалке. Далее мембраны инкубировали с первичными антителами 16 ч при 4 °С. В качестве первичных антител использовали поликлональные кроличьи антитела к белку Anks1a. В качестве контроля загрузки использовали моноклональные мышинные антитела к γ-тубулину GTU88 («Sigma», США). После отмывки фосфатным буфером с добавлением 0,1% (v/v) Tween-20 мембраны инкубировали со вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой («Jackson ImmunoResearch», Великобритания), в течение 1 ч при комнатной температуре. Сигнал детектировали с помощью Pierce ECL Western Blotting Substrate («Thermo Fisher Scientific», США), изображения получали с помощью прибора Image Quant LAS 4000 («GE Healthcare»). Для денситометрии полученных изображений блотов использовали программу ImageJ. Значения относительного поглощения полос Anks1a (в у.е.) нормировали на маркерный белок – γ-тубулин.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных и построе-

ние графиков во всех количественных экспериментах проводили в программе MS Excel («Microsoft», США), используя *t*-критерий Стьюдента. Данные представляли как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (standard error of mean, SEM).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка способности Anks1a взаимодействовать с Rac1. Чтобы выяснить, способен ли Anks1a образовывать комплекс с малой ГТФазой Rac1, был проведен анализ GST pull-down для Rac1 (WT) и RacQ61L (активированная форма Rac1). Мы определили, что Anks1a способен связываться с Rac1, но только в том случае, когда Rac1 находится в активированном состоянии (рис. 1, а). Это говорит о потенциале Anks1a быть эффектором активированной малой ГТФазы Rac. Мы рассмотрели, как распределяется Anks1a в псевдонормальных клетках МЖ MCF-10A и клетках MCF-10A с конститутивно активным Rac – MCF-10A RacQL. В контрольных MCF-10A Anks1a выявляется в околоядерном пространстве, а также наблюдается усиление интенсивности окрашивания на активном крае в зоне ламеллиподий, где активность Rac наиболее высока [33–34]. Клетки MCF-10A RacQL с конститутивно активным Rac сильно распластаны, но мало подвижны, Anks1a располагается как в околоядерном пространстве, так и на активном крае клетки (рис. 1, б), причем увеличение концентрации Anks1a на активном крае выражено гораздо сильнее, чем у контрольных клеток.

Таким образом, Anks1a взаимодействует с активированной формой Rac1, и в клетках с конститутивно активным Rac1 Anks1a частично перераспределяется к активному клеточному краю, что указывает на то, что Anks1a может принимать участие в регуляции клеточной подвижности в качестве эффектора Rac.

Распределение Anks1a в опухолевых клетках молочной железы. Для исследования участия Anks1a в регуляции движения клеток МЖ в качестве опухолевых линий МЖ мы выбрали клетки SK-BR-3 и MDA-MB-231 с разным статусом HER2. Опухолевые клетки обеих линий (SK-BR-3 и MDA-MB-231) в редкой культуре не образуют плотных островков и располагаются или в разреженных островках, или поодиночке, при этом имеют активные края с ярко выраженными ламеллиподиями, что хорошо видно при окраске актина фаллоидином (рис. 2). С помощью Вестерн-блота мы оценили количество Anks1a в исследуемых линиях. Разницы в количестве Anks1a

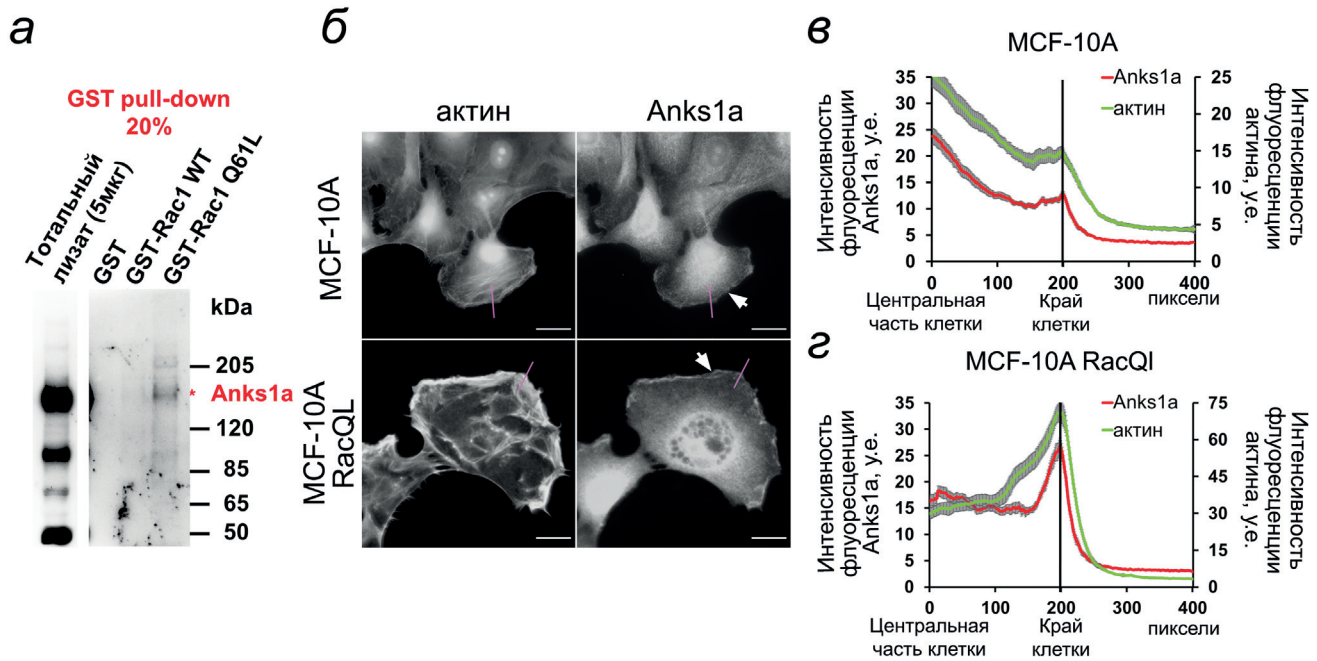


Рис. 1. Взаимодействие Anks1a с Rac1. *а* – GST pull-down-анализ. Для Вестерн-блота использовали 20% от полученного объема лизата после отмывки гранул глутатион-сефарозы. Звездочкой обозначена молекулярная масса Anks1a (170 кДа). *б* – Распределение Anks1a в псевдонормальных (MCF-10A) клетках и в клетках с конститутивно активным Rac1 (MCF-10A RacQL). Окрашивание актина – фаллоидин–Alexa 488. Стрелкой указано распределение Anks1a на краю клетки. Масштабная линия – 10 мкм. *в* и *з* – Графики изменения интенсивности флуоресценции белка Anks1a вдоль фиолетовой линии (*б*), на активном крае клеток MCF-10A (*в*) и MCF-10A RacQL (*з*). Показана средняя интенсивность флуоресценции \pm SEM; $n = 25$ клеток для каждого графика

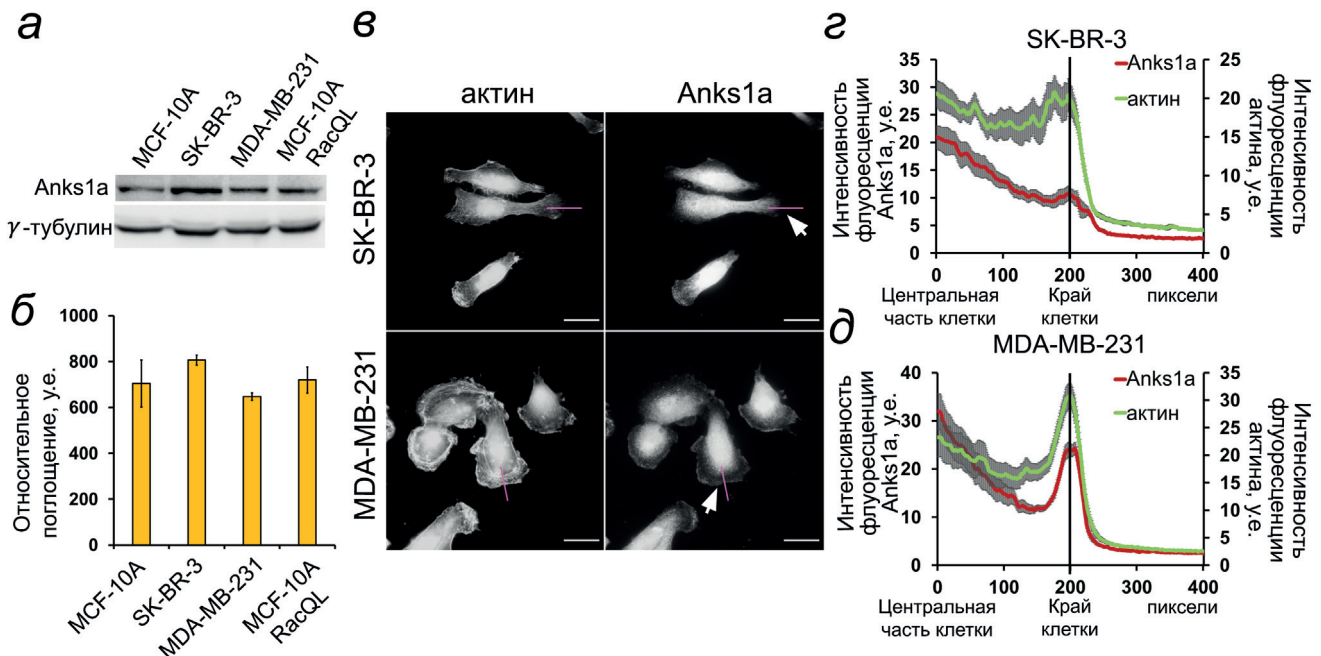


Рис. 2. Распределение белка Anks1a в опухолевых клетках молочной железы. *а* – Вестерн-блот клеточных линий MCF-10A, SK-BR-3, MDA-MB-231 и MCF-10A RacQL с окрашиванием на Anks1a и γ -тубулин. *б* – Денситометрия Вестерн-блота, приведенного на панели *а*, с выравниванием по γ -тубулину. *в* – Распределение белка Anks1a в опухолевых клетках (SK-BR-3 и MDA-MB-231) МЖ человека. Окрашивание актина – фаллоидин–Alexa 488. Масштабная линия – 20 мкм. *з* и *д* – Графики изменения интенсивности флуоресценции белка Anks1a на активном крае клеток SK-BR-3 (*з*) и MDA-MB-231 (*д*) вдоль фиолетовых линий на панели *в*. Показана средняя интенсивность флуоресценции \pm SEM; $n = 25$ клеток для каждого графика

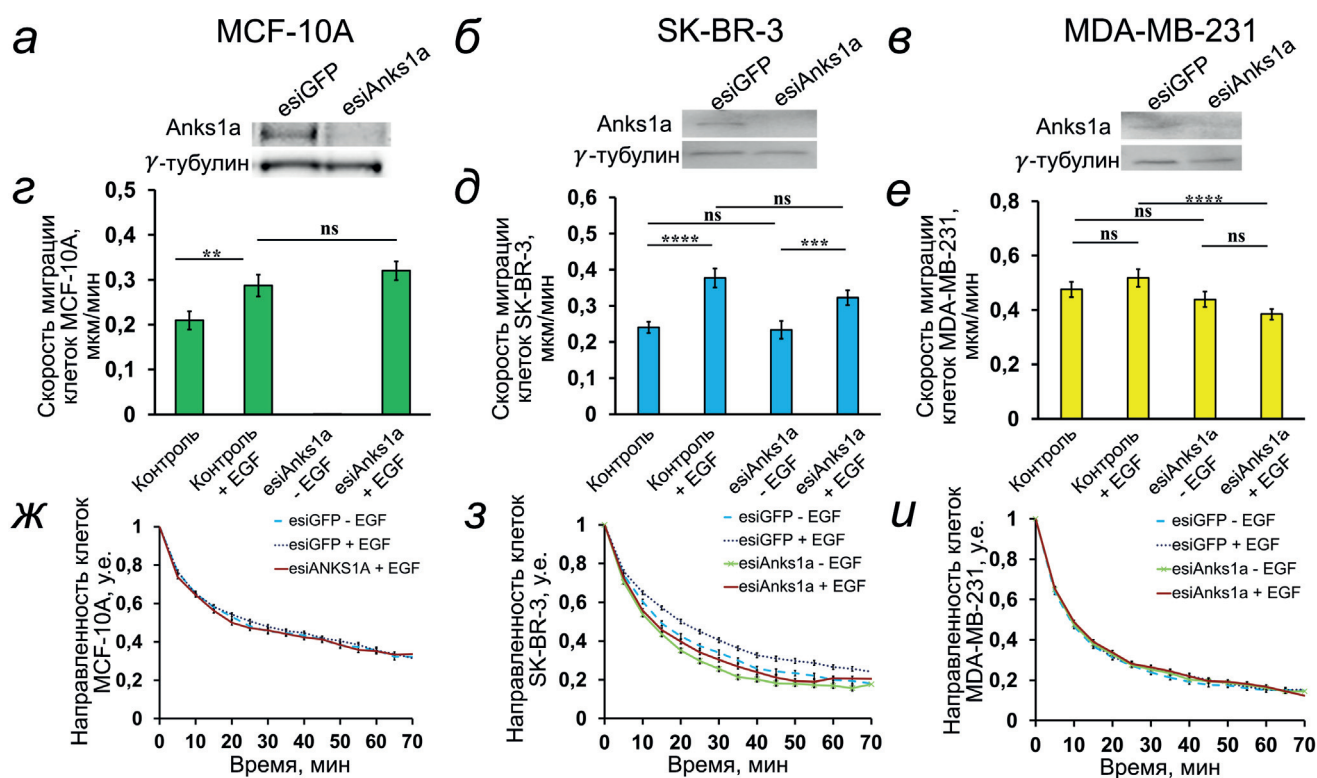


Рис. 3. Влияние подавления экспрессии Anks1a на миграционную активность клеток МЖ. *a–в* – Контроль экспрессии Anks1a после подавления Anks1a с помощью esiRNA (esiAnks1a), нормирование по γ -тубулину; *г–е* – скорости миграции клеток; *ж–и* – оценка направленности движения клеток с подавленной экспрессией белка Anks1a в присутствии и при отсутствии EGF. Данные представляют собой среднее значение \pm SEM, $n = 25$, использованы данные по меньшей мере от трех независимых экспериментов. Статистическая значимость различий определена по *t*-критерию Стьюдента: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns – статистически незначительные изменения

среди исследуемых культур обнаружено не было (рис. 2, *a* и *б*). При этом у SK-BR-3 Anks1a локализуется в центральной части клетки и в ядре, а на активном крае Anks1a практически не выявляется (рис. 2, *в* и *г*). У клеток MDA-MB-231 (тройной негативный рак) Anks1a выявляется как в центральной части клеток, так и на активном крае: там, где происходит Arp2/3-зависимая полимеризация актина (рис. 2, *в* и *д*).

Таким образом, в линии MDA-MB-231, в которой отсутствуют HER2, локализация Anks1a наблюдается в зоне краевой активности, тогда как у клеток SK-BR-3 не наблюдалось концентрации Anks1a на активном крае.

Влияние подавления экспрессии Anks1a на миграционную активность клеток МЖ. Экспрессия Anks1a была подавлена с помощью трансфекции клеток малыми интерферирующими РНК (Anks1a esiRNA). Контроль за подавлением экспрессии осуществляли с помощью Вестерн-блота (рис. 3, *a–в*). Мы оценивали количество движущихся клеток и характер их движения в контрольных культурах и в культурах, трансфицированных Anks1a esiRNA.

Клетки MCF-10A в редкой культуре малоподвижны, образуют островки. При добав-

лении EGF их подвижность увеличивается, увеличивается количество активно мигрирующих клеток, наблюдается расплывание клеток из островка. Подавление Anks1a при отсутствии EGF приводило к почти полной остановке клеток, а при добавлении EGF скорости движения подвижных контрольных клеток и клеток с подавленной экспрессией Anks1a практически не различались (рис. 3, *г*). Направленность движения MCF-10A также не менялась при подавлении Anks1a (рис. 3, *ж*).

Клетки SK-BR-3 (оверэкспрессирован HER2) очень чувствительны к присутствию EGF в среде, при добавлении EGF количество подвижных клеток увеличивается примерно на 10% (с 55 до 65%), а также возрастает скорость их миграции (рис. 3, *д*). Подавление активности Anks1a не оказывает существенного влияния на миграционные способности этих клеток как при отсутствии, так и в присутствии EGF, однако несколько снижает стимулирующий эффект EGF, хотя разница недостоверна. В то же время при подавлении экспрессии Anks1a движение клеток SK-BR-3 становится более хаотичным, направленность их движения по сравнению с контрольными значениями снижается (рис. 3, *з*).

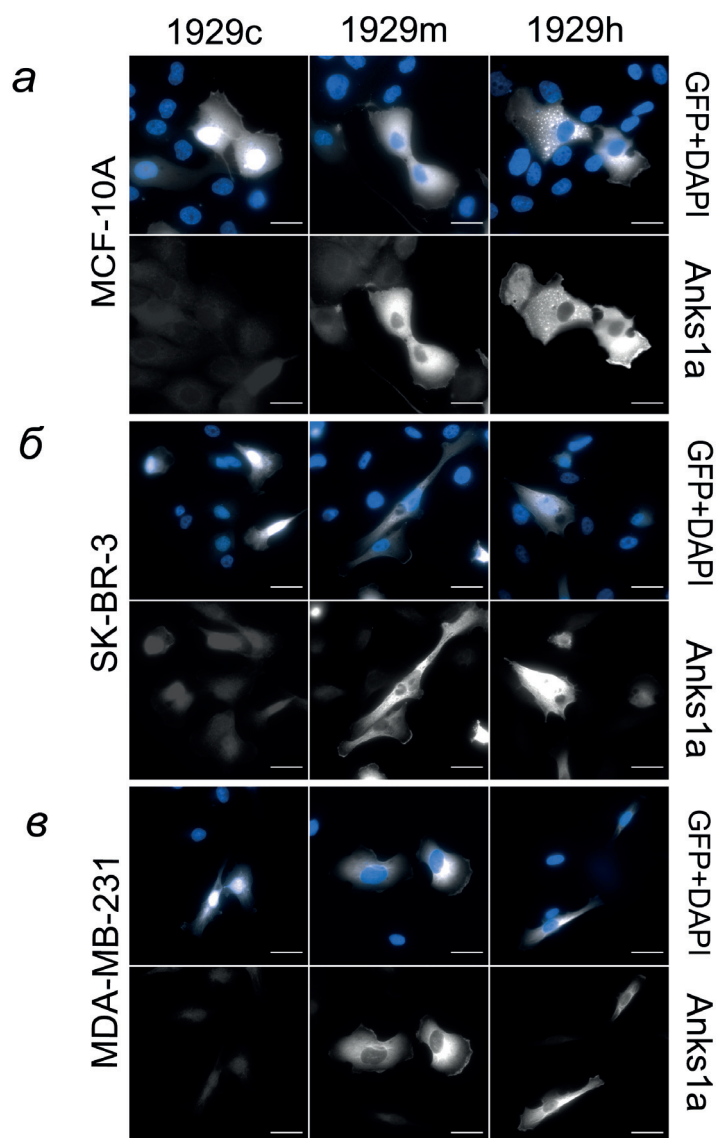


Рис. 4. Распределение Anks1a при гиперэкспрессии. 1929c, 1929m и 1929h – клетки, трансфицированные контрольной плазмидой 1929c и плазмидами 1929m и 1929h соответственно, трансфекция которыми приводит к увеличению экспрессии белка Anks1a. Окрашивание на Anks1a, DAPI, GFP. Трансфицированными считаем клетки, в которых детектируется свечение GFP, DAPI демонстрирует общее количество клеток на препарате. *a* – Распределение Anks1a в клетках MCF-10; *б* – распределение Anks1a в клетках SK-BR-3 с гиперэкспрессией HER2; *в* – распределение Anks1a в клетках MDA-MB-231 (трижды негативный рак). Флуоресцентная микроскопия. Масштабная линия – 20 мкм

Миграционная активность клеток MDA-MB-231 (отсутствуют HER2), как и следовало ожидать, практически не зависит от наличия EGF. Подавление экспрессии Anks1a не влияло на количество мигрирующих клеток, но скорость миграции активированных EGF клеток достоверно снижалась, направленность движения при этом не менялась (рис. 3, *e* и *и*). Этот эффект не зависит от участия Anks1a в обмене рецепторов HER2, и, таким образом, может зависеть от другой активности Anks1a, например, от его функции как эффектора Ras.

Внутриклеточное распределение Anks1a при гиперэкспрессии. Опыты по исследованию влияния гиперэкспрессии Anks1a на подвижность

клеток мы проводили в обычной для этих клеток культуральной среде без дополнительного стимулирования EGF. Контрольными считали клетки, полученные за счет трансфекции плазмидой 1929c, экспрессирующие GFP. В клетках MCF-10A в результате трансфекции контрольной плазмидой 1929c при флуоресцентном окрашивании интенсивность и распределение свечения Anks1a не менялись. В клетках с гиперэкспрессией Anks1a (полученной за счет трансфекции как плазмидой 1929m, так и плазмидой 1929h) наблюдается существенное увеличение интенсивности флуоресценции Anks1a, кроме того, наблюдается перераспределение Anks1a к активному свободному краю клеток

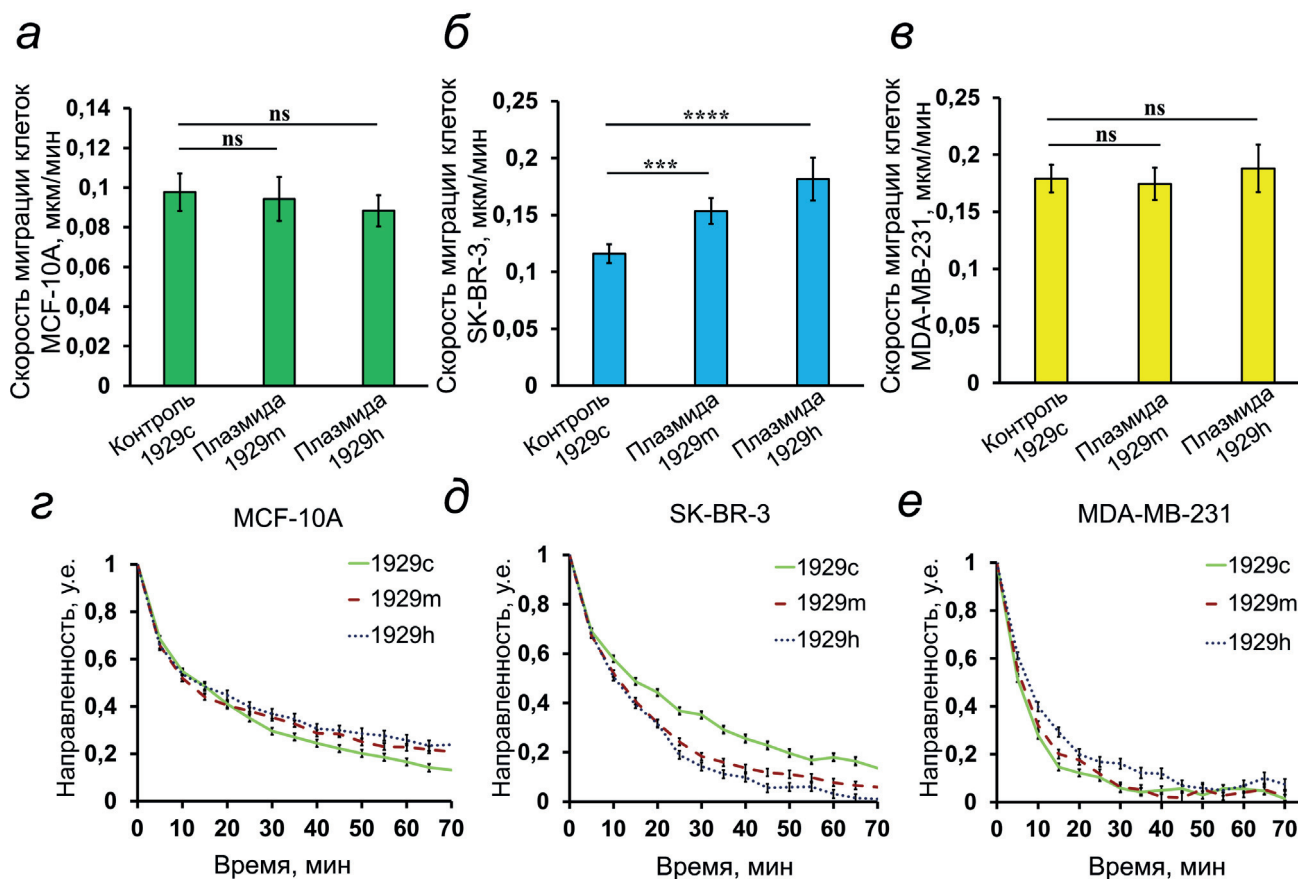


Рис. 5. Влияние сверхэкспрессии Anks1a на миграционную активность клеток МЖ. *a–в* – Скорости и *г–е* – направленность движения клеток с сверхэкспрессией белка Anks1a. 1929с, 1929m и 1929h – клетки, трансфицированные контрольной плазмидой 1929с и плазмидами 1929m и 1929h соответственно, трансфекция которых приводит к увеличению экспрессии белка Anks1a. Данные представляют собой среднее значение \pm SEM по меньшей мере трех независимых экспериментов. Статистическая значимость различия определена по *t*-критерию Стьюдента: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns – статистически незначительные изменения

(обозначено белыми стрелками) (рис. 4, *a*). Степень распластанности клеток с сверхэкспрессией Anks1a существенно не отличается от контрольной.

Клетки аденокарциномы SK-BR-3 мелкие, преимущественно одиночные, часто поляризованы, образуют ламеллиподию на ведущем крае.

В контрольных SK-BR-3, трансфицированных 1929с, Anks1a располагается в околоядерной области. Клетки с сверхэкспрессией Anks1a, полученной в результате трансфекции плазмидами 1929m и 1929h, выглядят более распластанными, по сравнению с контрольными, наблюдается перераспределение Anks1a, увеличивается его свечение на активном крае клетки (рис. 4, *б*).

Контрольные клетки трижды негативной аденокарциномы МЖ человека MDA-MB-231 имеют фибробластоподобную форму. В культуре, преимущественно, располагаются одиночно или парами, редко небольшими островками.

В клетках MDA-MB-231, трансфицированных 1929с (контроль), Anks1a располагает-

ся в околоядерной области, а также на активном крае клетки. В клетках с сверхэкспрессией Anks1a не наблюдается заметного перераспределения Anks1a. Степень распластанности клеток с сверхэкспрессией Anks1a также существенно не отличается от контрольных (рис. 4, *в*).

Влияние сверхэкспрессии Anks1a на миграционную активность клеток. Мы анализировали изменение скорости движения клеток при сверхэкспрессии Anks1a (рис. 5). Полученные данные свидетельствуют, что достоверное значимое изменение в скорости миграции происходит только при сверхэкспрессии белка в клетках SK-BR-3, при этом эффект увеличения скорости миграции происходит как в клетках, трансфицированных плазмидой 1929m, так и плазмидой 1929h. При этом уменьшалась направленность движения этих клеток. В клетках MCF-10A и MDA-MB-231 при сверхэкспрессии Anks1a достоверных изменений скорости движения отмечено не было, незначительно увеличивалась направленность движения MCF-10A.

Таким образом, сверхэкспрессия Anks1a большее влияние оказывает на подвижность тех клеток, в которых отмечено повышенное содержание HER2. Вероятно, это можно объяснить участием Anks1a в обмене тирозинкиназных рецепторов (РТК) и вовлечением в сигналинг EphA2/ErbB2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Целью нашей работы была оценка участия Anks1a в регуляции миграции клеток и выяснение возможных клеточных механизмов такого участия. По имеющимся литературным данным, Anks1a участвует в обмене рецепторов к эпидермальному фактору роста HER2 [27]. Методом GST pull-down мы показали, что Anks1a способен связываться с активированным Rac1, т.е. теоретически может быть его эффектором. Согласно результатам Вестерн-блот-анализа, количество белка Anks1a среди исследуемых культур не различалось. При этом в клетках с нормальным содержанием рецепторов к EGF и при их отсутствии Anks1a выявляется с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания как в центральной части клеток, так и на клеточном крае в местах ламеллиподиальной активности. Таким образом, его распределение на активном крае совпадает с распределением активного Rac, отвечающего за образование протрузий и за миграцию клеток [34–37]. В клетках SK-BR-3 с сверхэкспрессией рецептора EGF Anks1a выкрашивается в центральной части клеток и в ядре, а на краю ламеллиподии отсутствует. Можно предположить, что при сверхэкспрессии рецептора весь пул Anks1a оказывается вовлечен в обмен рецепторов, и он не поступает в места активности Rac.

Подвижность клеток MDA-MB-231, характеризующихся отсутствием экспрессии HER2, практически не зависела от присутствия EGF, но подавление Anks1a с помощью малых интерферирующих РНК приводило к незначительному снижению скорости миграции этих клеток. Также подавление экспрессии Anks1a привело к практически полной остановке движения клеток MCF-10A при отсутствии EGF и значительному снижению скорости этих клеток в присутствии EGF. Известно, что понижение активности Rac приводит к нарушению клеточной миграции [38]. Это позволяет предположить, что в клетках с недостатком рецепторов EGF Anks1a может принимать участие в регуляции миграции в качестве эффектора Rac, но, вероятно, этот эффект незначителен.

Поскольку, согласно литературным данным, в опухолях Anks1a часто сверхэкспресси-

рован [26], мы исследовали, как сверхэкспрессия Anks1a влияет на миграционное поведение нормальных и опухолевых клеток МЖ. Мы показали, что при сверхэкспрессии Anks1a в клеточных линиях MCF-10A и SK-BR-3, содержащих HER2, наблюдалось увеличение степени распластанности клеток. При этом интенсивность свечения Anks1a на активном крае клеток возрастала (рис 4, а и б). Это может являться следствием того, что при сверхэкспрессии избыток Anks1a может аккумулироваться в местах взаимодействия с активированным Rac и проявлять активность в качестве его эффектора. А клетки SK-BR-3 с амплифицированным HER2 в результате сверхэкспрессии Anks1a приобретали большую скорость и меньшую направленность миграции. Поскольку такого эффекта не наблюдалось в других исследованных клеточных линиях, действие Anks1a в этом случае, скорее всего, опосредовано его активностью при регуляции обмена тирозинкиназных рецепторов.

Таким образом, мы предполагаем, что Anks1a является эффектором активированного Rac, но влияние его в этом качестве, по крайней мере на исследованных нами клетках МЖ, минимально. Этот белок способен оказывать влияние на подвижность клеток МЖ благодаря его участию в механизме обмена рецепторов к EGF, а в клетках, где данные рецепторы отсутствуют (тройной негативный рак МЖ), значимого влияния Anks1a на миграционный потенциал опухолевых клеток отмечено не было. Из этого следует, что имеет смысл рассматривать подавление Anks1a в качестве возможного терапевтического подхода для подавления метастазирования только в случае опухолей, у которых отмечена повышенная экспрессия HER2/Neu, EphA2/ErbB2 или других РТК [23, 27]. Эффект такого подавления сводится не только к ингибированию миграции опухолевых клеток, но и будет обладать более широким действием, так как РТК вовлечены в регуляцию многих клеточных функций [23, 24].

Вклад авторов. А.Ю. Александрова, А.М. Готро – концепция и руководство работой; А.О. Жолудева, М.Е. Ломакина, Е.А. Орлова, Я. Ванг, А. Фокин, А. Полесская – проведение экспериментов; А.Ю. Александрова, А.М. Готро, А.О. Жолудева, М.Е. Ломакина, А. Фокин, А. Полесская – обсуждение результатов исследования; А.Ю. Александрова, А.О. Жолудева, М.Е. Ломакина, А. Фокин – написание и редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Международной ассоциированной лабора-

тории (ЛИА) «Поиск и характеристика новых белков, регулирующих клеточное движение и отвечающих за диссеминацию опухолевых клеток» и поддержана Российским фондом фундаментальных исследований НЦНИЛ_а (грант № 18-54-16006).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, **144**, 646-674, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Svitkina, T. (2018) The actin cytoskeleton and actin-based motility, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **10**, a018267, doi: 10.1101/cshperspect.a018267.
- Bonello, T. T., Stehn, J. R., and Gunning, P. W. (2009) New approaches to targeting the actin cytoskeleton for chemotherapy, *Future Med. Chem.*, **1**, 1311-1331, doi: 10.4155/fmc.09.99.
- Raftopoulou, M., and Hall, A. (2004) Cell migration: Rho GTPases lead the way, *Dev. Biol.*, **265**, 23-32, doi: 10.1016/j.ydbio.2003.06.003.
- Hall, A., and Nobes, C. D. (2000) Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **355**, 965-970, doi: 10.1098/rstb.2000.0632.
- Krugmann, S., Jordens, I., Gevaert, K., Driessens, M., Vandekerckhove, J., and Hall, A. (2001) Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53: Mena complex, *Curr. Biol.*, **11**, 1645-1655, doi: 10.1016/S0960-9822(01)00506-1.
- Charras, G., and Paluch, E. (2008) Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 730-736, doi: 10.1038/nrm2453.
- Wang, W., Wyckoff, J. B., Frohlich, V. C., Oleynikov, Y., Hüttelmaier, S. et al. (2002) Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling, *Cancer Res.*, **62**, 6278-6288.
- Wang, W., Wyckoff, J. B., Goswami, S., Wang, Y., Sidani, M., et al. (2007) Coordinated regulation of pathways for enhanced cell motility and chemotaxis is conserved in rat and mouse mammary tumors, *Cancer Res.*, **67**, 3505-3511, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3714.
- Pankov, R., Endo, Y., Even-Ram, S., Araki, M., Clark, K., Cukierman, E., Matsumoto, K., and Yamada, K. M. (2005) A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration, *J. Cell Biol.*, **170**, 793-802, doi: 10.1083/jcb.200503152.
- Zhou, K., Rao, J., Zhou, Z. H., Yao, X. H., Wu, F., Yang, J., Yang, L., Zhang, X., Cui, Y.-H., Bian, X.-W., Shi, Yu, and Ping, Yi-F. (2018), RAC1-GTP promotes epithelial-mesenchymal transition and invasion of colorectal cancer by activation of STAT3, *Lab. Invest.*, **98**, 989-998, doi: 10.1038/s41374-018-0071-2.
- Kurisu, S., Suetsugu, S., Yamazaki, D., Yamaguchi, H., and Takenawa, T. (2005) Rac-WAVE2 signaling is involved in the invasive and metastatic phenotypes of murine melanoma cells, *Oncogene*, **24**, 1309-1319, doi: 10.1038/sj.onc.1208177.
- Rana, P. S., Alkrekshi, A., Wang, W., Markovic, V., and Sossey-Alaoui, K. (2021) The role of WAVE2 signaling in cancer, *Biomedicines*, **9**, 1217, doi: 10.3390/biomedicines9091217.
- Taniuchi, K., Yawata, T., Tsuboi, M., Ueba, T., and Saibara, T. (2019) Efficient delivery of small interfering RNAs targeting particular mRNAs into pancreatic cancer cells inhibits invasiveness and metastasis of pancreatic tumors, *Oncotarget*, **10**, 2869-2886, doi: 10.18632/oncotarget.26880.
- Takahashi, K., and Suzuki, K. (2011) WAVE2, N-WASP, and Mena facilitate cell invasion via phosphatidylinositol 3-kinase-dependent local accumulation of actin filaments, *J. Cell Biochem.*, **112**, 3421-3429, doi: 10.1002/jcb.23276.
- Wang, W., Eddy, R., and Condeelis, J. (2007) The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis, *Nat. Rev. Cancer*, **7**, 429-440, doi: 10.1038/nrc214.
- Sinha, P., Hütter, G., Köttgen, E., Dietel, M., Schandendorf, D., and Kage, H. (1999) Increased expression of epidermal fatty acid binding protein, cofilin, and 14-3-3-sigma (stratifin) detected by two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing of drug-resistant human adenocarcinoma of the pancreas, *Electrophoresis*, **20**, 2952-2960, doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(19991001)20:14<2952::AID-ELPS2952>3.0.CO;2-H.
- Gunnensen, J. M., Spirkoska, V., Smith, P. E., Danks, R. A., and Tan, S. S. (2000) Growth and migration markers of rat C6 glioma cells identified by serial analysis of gene expression, *Glia*, **32**, 146-154.
- Davila, M., Frost, A. R., Grizzle, W. E., and Chakrabarti, R. (2003) LIM kinase 1 is essential for the invasive growth of prostate epithelial cells: implications in prostate cancer, *J. Biol. Chem.*, **278**, 36868-36875, doi: 10.1074/jbc.M306196200.
- Yoshioka, K., Foletta, V., Bernard, O., and Itoh, K. (2003) A role for LIM kinase in cancer invasion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 7247-7252, doi: 10.1073/pnas.1232344100.
- Pandey, A., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Fernandez, M., Nielsen, M., Kristiansen, T. Z., Ohara, O.,

- Podtelejnikov, A. V., Roche, S., Lodish, H. F., and Mann, M. (2002) Cloning of a novel phosphotyrosine binding domain containing molecule, Odin, involved in signaling by receptor tyrosine kinases, *Oncogene*, **21**, 8029-8036, doi: 10.1038/sj.onc.1205988.
22. Shin, J., Gu, C., Park, E., and Park, S. (2007) Identification of phosphotyrosine binding domain-containing proteins as novel downstream targets of the EphA8 signaling function, *Mol. Cell Biol.*, **27**, 8113-8126, doi: 10.1128/MCB.00794-07.
 23. Casaletto, J. B., and McClatchey, A. I. (2012) Spatial regulation of receptor tyrosine kinases in development and cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **12**, 387-400, doi: 10.1038/nrc3277.
 24. Lemmon, M. A., and Schlessinger, J. (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell*, **141**, 1117-1134, doi: 10.1016/j.cell.2010.06.011.
 25. Park, S., Lee, H., Lee, J., Park, E., and Park, S. (2019) Ependymal cells require Anks1a for their proper development, *Mol. Cells*, **42**, 245-251, doi: 10.14348/molcells.2018.0432.
 26. Lee, Y., Yoon, K. A., Joo, J., Lee, D., Bae, K., Han, Ji-Y., and Lee, J.-S. (2013) Prognostic implications of genetic variants in advanced non-small cell lung cancer: a genome-wide association study, *Carcinogenesis*, **34**, 307-313, doi: 10.1093/carcin/bgs356.
 27. Lee, H., Noh, H., Mun, J., Gu, C., Sever, S., and Park, S. (2016) Anks1a regulates COPII-mediated anterograde transport of receptor tyrosine kinases critical for tumorigenesis, *Nat. Commun.*, **7**, 12799, doi: 10.1038/ncomms12799.
 28. Tong, J., Sydorsky, Y., St-Germain, J. R., Taylor, P., Tsao, M. S., and Moran, M. F. (2013) Odin (ANKS1A) modulates EGF receptor recycling and stability, *PLoS One*, **8**, e64817, doi: 10.1371/journal.pone.006481.
 29. Kristiansen, T. Z., Nielsen, M. M., Blagoev, B., Pandey, A., and Mann, M. (2004) Mouse embryonic fibroblasts derived from Odin deficient mice display a hyperproliferative phenotype, *DNA Res.*, **11**, 285-292.
 30. Sladitschek, H. L., and Neveu, P. A. (2015) MXS-chaining: a highly efficient cloning platform for imaging and flow cytometry approaches in mammalian systems, *PLoS One*, **10**, e0124958, doi: 10.1371/journal.pone.0124958.
 31. Molinie, N., Rubtsova, S. N., Fokin, A., Visweshwaran, S. P., Rocques, N., Polesskaya, A., Schnitzler, A., Vacher, S., Denisov, E. V., Tashireva, L. A., Perelmuter, V. M., Cherdyntseva, N. V., Bièche, I., and Gautreau, A. M. (2019) Cortical branched actin determines cell cycle progression, *Cell Res.*, **29**, 432-445, doi: 10.1038/s41422-019-0160-9.
 32. Gorelik, R., and Gautreau, A. (2014) Quantitative and unbiased analysis of directional persistence in cell migration, *Nat. Protoc.*, **9**, 1931-1943, doi: 10.1038/nprot.2014.131.
 33. Holliday, D. L., and Speirs, V. (2011) Choosing the right cell line for breast cancer research, *Breast Cancer Res.*, **13**, 215, doi: 10.1186/bcr2889.
 34. Kraynov, V. S., Chamberlain, C., Bokoch, G. M., Schwartz, M. A., Slabaugh, S., and Hahn, K. N. (2000) Localized Rac activation dynamics visualized in living cells, *Science*, **290**, 333-337, doi: 10.1126/science.290.5490.333.
 35. Mehidi, A., Rossier, O., Schaks, M., Chazeau, A., Binamé, F., Remorino, A., Coppey, M., Karatas, Z., Sibarita, J.-P., Rottner, K., Moreau, V., and Giannone, G. (2019) Transient activations of Rac1 at the lamellipodium tip trigger membrane protrusion, *Curr. Biol.*, **29**, 2852-2866.e5, doi: 10.1016/j.cub.2019.07.035.
 36. Itoh, R. E., Kurokawa, K., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Mochizuki, N., and Matsuda, M. (2002) Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells, *Mol. Cell Biol.*, **22**, 6582-6591, doi: 10.1128/MCB.22.18.6582-6591.2002.
 37. Steffen, A., Ladwein, M., Dimchev, G. A., Hein, A., Schwenkmezger, L., Arens, S., Ladwein, K. I., Holleboom, J. M., Schur, F., Small, J. V., Schwarz, J., Gerhard, R., Faix, J., Stradal, T. E. B., Brakebusch, C., and Rottner, K. (2013) Rac function is crucial for cell migration but is not required for spreading and focal adhesion formation, *J. Cell Sci.*, **126**, 4572-4588, doi: 10.1242/jcs.118232.
 38. Weiss-Haljiti, C., Pasquali, C., Ji, H., Gillieron, C., Chabert, C., Curchod, M. L., Hirsch, E., Ridley, A. J., van Huijsduijnen, R. H., Camps, M., and Rommel, C. (2004) Involvement of phosphoinositide 3-kinase gamma, Rac, and PAK signaling in chemokine-induced macrophage migration, *J. Biol. Chem.*, **279**, 43273-43284, doi: 10.1074/jbc.M402924200.

ROLE OF THE ADAPTER PROTEIN Anks1a IN REGULATING BREAST CANCER CELL MOTILITY

A. O. Zholudeva¹, M. E. Lomakina^{1,2}, E. A. Orlova¹, Y. Wang², A. Fokin², A. Polesskaya²,
A. M. Gautreau², and A. Y. Alexandrova^{1*}

¹ Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia,
115478 Moscow, Russia; e-mail: tonya_alex@yahoo.com

² CNRS UMR7654, Ecole Polytechnique, Institut Polytechnique de Paris, 91120 Palaiseau, France

A critical step in tumor progression is the epithelial-mesenchymal transition, as a result of which cancer cells (CCs) acquire the ability to mesenchymal migration, the main regulator of which is the Rac→WAVE→Arp2/3 signaling pathway. It was previously shown that proteins interacting with Rac can regulate mesenchymal migration and thus determine the metastasis efficiency. The search for new regulators of migration is an actual theoretical and practical task. The adaptor protein Anks1a is one of the proteins interacting with Rac, the change in its expression has been shown for many tumors. The aim of this study was to find out whether Anks1a affects CC migration and to identify the mechanism underlying its effect. It has been suggested that Anks1a can influence CC migration either as a Rac1 effector or by activation of exchange of human epidermal growth factor receptor-2 (HER2). The effect of enhancing and downregulation of Anks1a expression on the migration of breast cancer cells with different HER2 status was investigated. Anks1a was shown to interact with the activated form of Rac1. In the MDA-MB-231 cells (triple negative cancer), which lacks HER2, Anks1a accumulates at the active cell edge, which is characterized by enrichment with active Rac1, whereas in SK-BR-3 cells (HER2 overexpressed) no concentration of Anks1a at the active edge was observed. Inhibition of *ANKS1a* expression by esiRNA had almost no effect on the CC motility; there was only a slight increase in the average rate of cell migration in MDA-MB-231 cells. Overexpression of Anks1a leads to an increase in migration rate of only SK-BR-3 cells, i.e., it affects migration only in case of overexpression of HER2. We showed that Anks1a is an effector of activated Rac1, but its influence on cell migration in this capacity is minimal, at least on the breast cell cultures we studied. Anks1a affects the motility of breast cancer cells due to its involvement in the mechanism of EGF receptor exchange.

Keywords: Anks1a, cell migration, breast cancer, metastasis