

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-82-89



Экспрессия белков цитоскелета – цитокератинов и бета-III тубулина в клетках культур меланомы человека из коллекции НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина

Т.А. Богуш, И.Э. Мизаева, А.А. Башарина, А.Н. Гришанина, М.А. Барышникова, О.С. Бурова, А.А. Рудакова, В.С. Косоруков

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анна Александровна Башарина basharinaa@inbox.ru

Введение. Несмотря на достижения в лечении меланомы, результаты терапии нельзя признать удовлетворительными, и поиск новых препаратов и эффективных комбинаций лекарств продолжается. Разрабатываются препараты, направленные на снижение метастатического потенциала опухолей, – мигростатики. Точкой приложения этой группы препаратов могут являться белки цитоскелета опухолевой клетки, к которым относятся промежуточные филаменты – цитокератины (ЦК) и белок микротрубочек бета-III тубулин (TUBB3).

Цель исследования – формирование панели культур клеток меланомы с охарактеризованной экспрессией ЦК и TUBB3 для создания информативной клеточной модели *in vitro* для скрининга и изучения мигростатиков.

Материалы и методы. Исследован молекулярный фенотип 21 культуры клеток меланомы из коллекции клеточных линий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, из которых 18 культур получены из метастазов опухоли в лимфатические узлы, мягкие ткани или подкожно. Оценка уровня экспрессии TUBB3 и *de novo* экспрессии ЦК в клетках, экспрессирующих виментин (Вим) (ЦК + Вим), проведена иммунофлуоресцентным методом, ассоциированным с проточной цитометрией.

Результаты. Экспрессия TUBB3 выявлена во всех исследованных культурах, *de novo* экспрессия ЦК – в 20 из 21 культуры. Исключение составила первичная увеальная меланома 92-1, не экспрессирующая ЦК + Вим. Оба показателя значительно различались между клетками исследованной панели: коэкспрессия ЦК + Вим – от 0 до 91 %, TUBB3 – от 18 до 86 %. Корреляции между уровнями экспрессии TUBB3 и ЦК + Вим не выявлено (коэффициент корреляции Пирсона $r = 0,11$; $p = 0,65$). Выделены 3 группы культур клеток с разным соотношением уровня экспрессии TUBB3 и коэкспрессии ЦК + Вим: 1) сходный уровень показателей экспрессии маркеров; 2) уровень коэкспрессии ЦК + Вим в большей или меньшей степени превышает показатель для TUBB3; 3) уровень экспрессии TUBB3 в разной степени превышает показатель коэкспрессии ЦК + Вим.

Заключение. Сформирована панель из 21 культуры клеток меланомы человека, в которых количественно охарактеризована экспрессия ЦК и TUBB3 – белков цитоскелета, ответственных за миграционную активность опухолевых клеток. Группы культур с разным соотношением показателей экспрессии этих маркеров могут быть использованы для скрининга и доклинической оценки потенциальных мигростатиков, которые уменьшают метастатический потенциал меланомы и могут снижать резистентность к таксанам.

Ключевые слова: культуры клеток меланомы человека, бета-III тубулин, цитокератины, мигростатики, цитостатики, панель клеток

Для цитирования: Богуш Т.А., Мизаева И.Э., Башарина А.А. и др. Экспрессия белков цитоскелета – цитокератинов и бета-III тубулина в клетках культур меланомы человека из коллекции НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(3):82–9. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-82-89

Expression of the cytoskeletal proteins – cytokeratins and beta-III tubulin in human melanoma cell lines from the collection of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology

T.A. Bogush, I.E. Mizaeva, A.A. Basharina, A.N. Grishanina, M.A. Baryshnikova, O.S. Burova, A.A. Rudakova, V.S. Kosorukov

N.N. Blokhin National Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia

Contacts: Anna Aleksandrovna Basharina basharinaa@inbox.ru

Introduction. Despite advances in the treatment of melanoma, the results of therapy cannot be considered satisfactory, and the search for new drugs and effective combinations of medicine continues. The drugs are being developed aimed at reducing the metastatic tumor potential – migrastatics. The targets of the drugs can be cytoskeletal proteins of tumor cells – cytokeratin (CK) intermediate filaments and microtubule protein beta-III tubulin (TUBB3).

Aim. To estimate of the CK and TUBB3 expression in melanoma cell lines to form an informative *in vitro* cell model for screening and studying migrastatics.

Materials and methods. The molecular phenotype of 21 human melanoma cell lines from the collection of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, and 18 of which were isolated from tumor metastases in the lymph nodes, soft tissues or subcutaneously. The level of TUBB3 expression and *de novo* expression of CKs in vimentin-expressing cells (CK + Vim) were assessed by an immunofluorescent method and flow cytometry.

Results. Beta-III tubulin expression was detected in all cultures studied, *de novo* expression of CKs was found in 20/21 lines. The exception was primary uveal melanoma 92-1, that did not express CK + Vim. Both parameters significantly differed between the cells of the studied panel: CK + Vim co-expression – from 0 to 91 %, TUBB3 – from 18 to 86 %. No correlation was found between the expression level of TUBB3 and CK + Vim (Pearson's correlation coefficient $r = 0.11$; $p = 0.65$). Three groups of the cell lines with different ratio of TUBB3 expression and CK + Vim co-expression were identified: 1) similar level of expression of both markers; 2) the level of co-expression of CK + Vim more or less high than the index for TUBB3; 3) the level of TUBB3 expression more or less high than the index for CK + Vim co-expression.

Conclusion. A panel of 21 human melanoma cell lines was formed with quantitatively estimated expression of cytoskeletal proteins responsible for the migration activity of tumor cells – CKs and TUBB3. Groups of the lines with different expression ratio of the markers can be used for screening and preclinical evaluation potential migrastatics that reduce the metastatic potential of melanoma and may reduce resistance to taxanes.

Keywords: human melanoma cell lines, beta-III tubulin, cytokeratins, migrastatics, cytostatics, cell panel

For citation: Bogush T.A., Mizaeva I.E., Basharina A.A. et al. Expression of the cytoskeletal proteins – cytokeratins and beta-III tubulin in human melanoma cell lines from the collection of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(3):82–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-82-89

ВВЕДЕНИЕ

Меланома – агрессивное злокачественное новообразование, которое характеризуется высокой частотой метастазирования даже при небольшом размере первичного очага. Несмотря на достижения в лечении этого заболевания, результаты терапии нельзя признать удовлетворительными, и поиск новых препаратов и эффективных комбинаций лекарств продолжается [1]. В частности, разрабатываются препараты, направленные на снижение метастатического потенциала опухолей, – так называемые мигростатики [2, 3].

Важнейшей потенциальной точкой приложения этой группы лекарств являются белки цитоскелета опухолевой клетки, к которым относятся промежуточные филаменты цитокератины (ЦК) и белок микротрубочек бета-III тубулин (TUBB3).

Цитокератины являются облигатным маркером эпителиальных новообразований, однако их экспрессия обнаружена и в клетках меланомы, экспрессирующих виментин (Вим). При этом в фундаментальных исследованиях на культурах клеток показано, что *de novo* экспрессия ЦК увеличивает динамическую активность клеток меланомы, а именно повышает скорость миграции клеток через поры мембраны [4, 5] и инвазии через матригель [4–6]. Напротив, нокдаун ЦК в культуре клеток меланомы уменьшает скорость инвазии через матригель, а также заживления раны [7].

В клинических исследованиях продемонстрировано, что высокий уровень экспрессии матричной РНК

ЦК коррелирует с поздней стадией заболевания и низкими показателями общей выживаемости больных меланомой [8]. Более того, экспрессия ЦК чаще выявляется в метастатических меланомах и потому рассматривается как показатель дедифференцировки этого новообразования [9–12].

Что касается белка микротрубочек TUBB3, который конститутивно экспрессируется в ткани меланомы, его ингибирование в клетках культур меланомы приводит к нарушению динамики микротрубочек и снижает метастатический потенциал опухолевых клеток [13, 14]. При этом в клинических исследованиях показано, что снижение уровня экспрессии TUBB3 в опухоли является неблагоприятным фактором прогноза и коррелирует с худшими показателями безрецидивной и общей выживаемости [15, 16].

Важнейшая биологическая характеристика TUBB3 заключается в том, что этот белок в опухолях разного генеза является мишенью противоопухолевых препаратов из группы таксанов. Гиперэкспрессия TUBB3 ассоциирована с резистентностью к этим лекарственным средствам, тогда как при ингибировании TUBB3 чувствительность опухолей к таксанам восстанавливается [17].

Целью исследования явилось формирование панели культур клеток меланомы с охарактеризованной экспрессией этих важнейших белков цитоскелета – ЦК и TUBB3 для создания информативной клеточной модели *in vitro* для скрининга и изучения соединений,

ингибирующих метастатический потенциал опухолей и резистентность к противоопухолевым таксанам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры клеток меланомы. В работе исследована 21 культура клеток меланомы из коллекции клеточных линий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Три культуры клеток меланомы получены из первичного опухолевого узла: 92-1 – увеальная меланома; Mel May и A-375 – меланома кожи. Культуры клеток Mel H, Mel Cher, Mel Si, A-052, Mel Rac, Mel II, Mel Bgf, Mel Hn, Mel Gi, Mel Gus, Mel Me, Mel Ibr, Mel Mtp, Mel Ch, Mel Ki, Mel Kor, A-875 и Mel R получены из метастазов меланомы кожи в лимфатические узлы, мягкие ткани или подкожно.

Клетки культивировали в среде RPMI-1640 («Панэко») с 10 % телячьей эмбриональной сывороткой (Biosera) в инкубаторе при +37 °C в атмосфере 5 % CO₂. В экспериментах использовали клетки сформированного монослоя.

Клетки инкубировали в течение 15 мин при 37 °C в растворе Версена («Панэко»), снимали с подложки, суспендировали, осаждали центрифугированием при 1000 оборотах в течение 5 мин при комнатной температуре. В полученном осадке клетки фиксировали 4 % раствором формальдегида (pH 7,4).

Иммунофлуоресцентный анализ и проточная цитометрия. Оценку экспрессии TUBB3 проводили с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания и проточной цитометрии [18]. Кратко, одноклеточную суспензию инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре в темноте с первичными моноклональными антителами к TUBB3 (клон EP1569Y, Abcam) в конечном разведении 1: 8000. После однократной отмывки 20-кратным объемом 0,5 % раствора бычьего сывороточного альбумина (BSA) добавляли вторичные антитела, конъюгированные с DyLight 650 (ab98729, Abcam) в конечном разведении 1: 500, и инкубировали в течение 1,5 ч при +4 °C в темноте. Далее клетки инкубировали в течение 15 мин с ДНК-красителем Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) для дальнейшего удаления из анализа дебриса и конгломератов клеток. Анализ проводили после двукратной отмывки 20-кратным объемом 0,5 % раствора BSA.

Специфическая флуоресценция клеток рассчитана в программе FlowJo v.10.0.8 с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Оценивали уровень экспрессии TUBB3 (в процентах): число специфически флуоресцирующих клеток относительно контроля (инкубация клеток только с вторичными антителами). Различия в величине показателей экспрессии маркеров в повторных экспериментах на одной и той же культуре клеток не превысили 5 %, поэтому в иллюстративный материал включены результаты одного из типичных экспериментов.

Для оценки *de novo* экспрессии ЦК в клетках культуры меланом использован ассоциированный с проточ-

ной цитометрией метод двойного иммунофлуоресцентного окрашивания, разработанный в нашей лаборатории [19]. Кратко, одноклеточную суспензию клеток инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте с первичными моноклональными антителами к ЦК 5/6/8/17/19 (клон MNF116, DAKO). После однократной отмывки 20-кратным объемом 0,5 % раствора BSA к клеткам добавляли антитела к мезенхимальному белку Вим (клон SP20, Bioss) и инкубировали в тех же условиях. Конечное разведение обоих первичных антител – 1: 2000. По завершении инкубации клетки отмывали 20-кратным объемом 0,5 % раствора BSA, одноклеточную суспензию клеток инкубировали в течение 1,5 ч при +4 °C в темноте с двумя вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом DyLight 488 (ab96871, Abcam) или DyLight 650 (ab98729, Abcam) в конечном разведении 1: 240 и 1: 500 соответственно. Далее клетки инкубировали в течение 15 мин с ДНК-красителем Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) для дальнейшего удаления из анализа дебриса и конгломератов клеток. Анализ проводили после двукратной отмывки 20-кратным объемом 0,5 % раствора BSA. Уровень *de novo* экспрессии ЦК определяли как отношение (%) числа клеток, коэкспрессирующих ЦК и Вим, к общему числу опухолевых клеток, экспрессирующих Вим.

Флуоресценцию клеток измеряли на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter). Для визуализации распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции использовали гистограммы и точечные диаграммы, построенные в программе WinMDI 2.9.

Статистическая обработка результатов. Статистическая обработка данных проведена с помощью программы GraphPad Prism 9.2 (GraphPad Software). Нормальность распределения образцов по уровню экспрессии маркеров оценена с помощью критерия Шапиро–Уилка. Коэффициент корреляции Пирсона использован для оценки ассоциативной связи между показателями экспрессии TUBB3 и ЦК. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Количественные показатели уровня *de novo* экспрессии цитокератинов и бета-III тубулина в культурах клеток меланомы. Результаты количественной оценки уровня *de novo* экспрессии ЦК и белка TUBB3 в клетках 21 культуры меланомы представлены на рис. 1 и в таблице. Видно, что оба показателя значительно различаются между клетками исследуемой панели: коэкспрессия ЦК и Вим (ЦК + Вим) – от 0 до 91 %, TUBB3 – от 18 до 86 %. Важно отметить, что коэкспрессия ЦК + Вим выявлена во всех 18 культурах клеток метастатической меланомы и в 2 из 3 культур первичной меланомы. *De novo* экспрессия ЦК не обнаружена только в первичной увеальной меланоме. Иными словами, включенные в панель культуры, за исключением

одной, по этому показателю следует отнести к агрессивному типу опухолей.

Характер распределения показателей экспрессии маркеров в исследованной группе культур был нормальным, поэтому их сравнение проведено по средним значениям, которые оказались близкими: 53,2 и 57,4 % для ЦК + Вим и TUBB3 соответственно.

Достаточное для статистических оценок количество исследованных культур ($n = 21$) позволило нам ответить на фундаментально важный вопрос о наличии корреляции между уровнем коэкспрессии ЦК + Вим и экспрессией TUBB3 при сравнении показателей в одних и тех же клеточных культурах. С учетом нормальности распределения обоих показателей для этой цели использован метод Пирсона, который

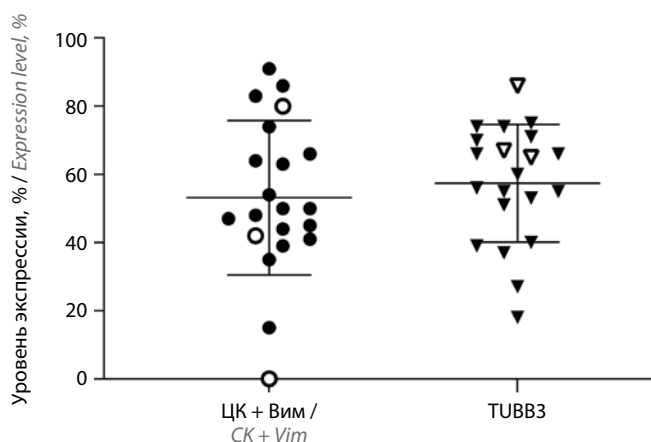


Рис. 1. Количественные показатели уровня коэкспрессии цитокератинов и виментина (ЦК + Вим) и экспрессии белка бета-III тубулина (TUBB3) в клетках 21 культуры меланомы. Белыми символами отмечены показатели уровня экспрессии маркеров в культурах клеток меланомы, полученных из первичных опухолей
Fig. 1. Quantitative data of cytokeratins and vimentin (CK + Vim) co-expression and beta-III tubulin expression in cells of 21 melanoma lines. White symbols indicate the levels of markers' expression in cell lines isolated from primary melanomas

не выявил корреляции, что указывает на отсутствие общих механизмов регуляции экспрессии этих опухолевых маркеров.

Подгруппы культур клеток меланомы с разным соотношением уровня коэкспрессии цитокератинов и виментина и экспрессии бета-III тубулина в одной и той же культуре. С учетом высокой гетерогенности исследуемой панели клеток меланом по уровню коэкспрессии ЦК + Вим и TUBB3, сформированы группы с разным соотношением показателей в одной и той же культуре (рис. 2).

Первая группа культур характеризуется сходным уровнем показателей экспрессии маркеров приблизительно от 40 до 80 %. Во 2-й группе клеток уровень коэкспрессии ЦК + Вим в большей или меньшей степени превышает показатель для TUBB3. В 3-й группе соотношение противоположное: уровень экспрессии TUBB3 в разной степени превышает показатель коэкспрессии ЦК + Вим. Интересна культура клеток первичной увеальной меланомы с высокой (65 %) экспрессией TUBB3 при отсутствии *de novo* экспрессии ЦК.

Примеры результатов, характеризующих культуры клеток меланомы по уровню коэкспрессии цитокератинов и виментина и экспрессии бета-III тубулина (иммунофлуоресцентный анализ и проточная цитометрия). Примеры реальных результатов иммунофлуоресцентного анализа, ассоциированного с проточной цитометрией, которые использованы для характеристики культур клеток меланомы по уровню коэкспрессии ЦК + Вим и экспрессии TUBB3, представлены на рис. 3. Приведены примеры культур с разным соотношением уровней экспрессии маркеров в разных подгруппах культур, включенных в клеточную панель (см. рис. 2).

Из 1-й подгруппы представлены результаты исследования культуры А-052 с высокой и приблизительно одинаковой экспрессией TUBB3 и коэкспрессией ЦК + Вим: 74 и 66 % соответственно. Из 2-й подгруппы продемонстрированы результаты исследования

Уровень коэкспрессии цитокератинов и виментина (ЦК + Вим) и экспрессии бета-III тубулина (TUBB3) в культурах клеток меланом ($n = 21$), %
 Level of cytokeratin and vimentin (CK + Vim) co-expression and beta-III tubulin (TUBB3) expression in melanoma cell lines ($n = 21$), %

Маркер Marker	$M \pm SD$	Me [Q1; Q3]	Min	Max	Проверка на нормальность распределения, p^* Normality test, p^*	Коэффициент корреляции Пирсона, r Pearson correlation coefficient, r
ЦК + Вим CK + Vim	$53,2 \pm 22,6$	50,0 [41,5; 70,0]	0,0	91,0	0,47	0,11; $p = 0,65$
TUBB3	$57,4 \pm 17,2$	60,0 [45,5; 70,5]	18,0	86,0	0,34	

*Нулевая гипотеза о нормальности распределения показателя в выборке, оцененная с помощью критерия Шапиро–Уилка (принималась при $p > 0,05$).

*The Shapiro–Wilk test was used to assess the null hypothesis about normality of the index distribution (it was accepted at $p > 0.05$).

Примечание. $M \pm SD$ – среднее арифметическое значение \pm стандартное отклонение; Me [Q1; Q3] – медиана [нижний квартиль; верхний квартиль]; min – минимальное значение; max – максимальное значение.

Note. $M \pm SD$ – arithmetic mean value \pm standard deviation; Me [Q1; Q3] – median [lower quartile; upper quartile]; min – minimum value; max – maximum value.

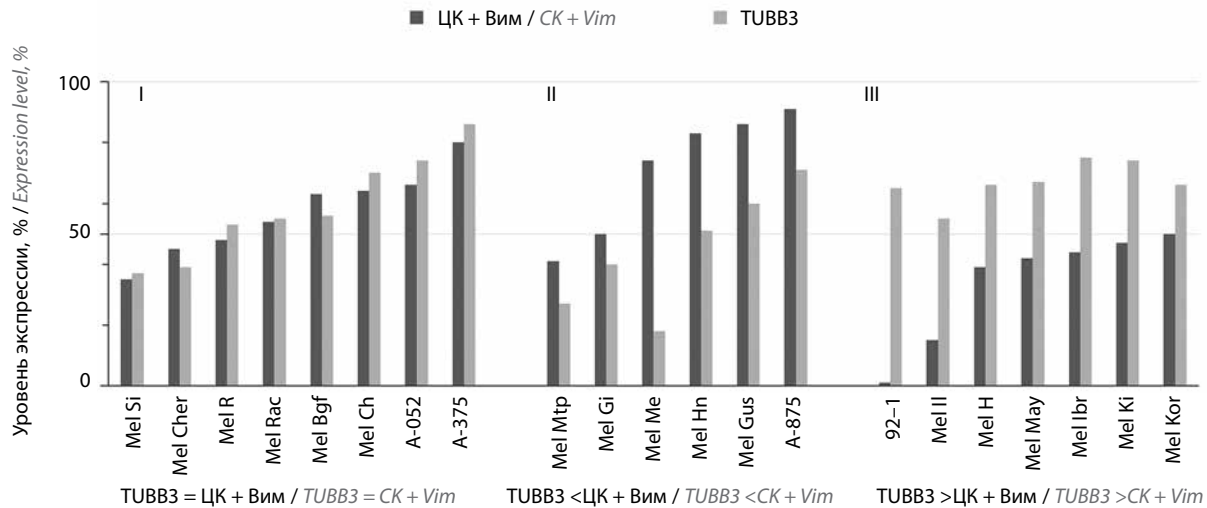


Рис. 2. Группы культур клеток меланомы с разным соотношением уровней коэкспрессии цитокератинов и виментина (ЦК + Вим) и экспрессии бета-III тубулина (TUBB3). Римскими цифрами обозначены номера групп

Fig. 2. Groups of melanoma cell cultures with different ratios of cytokeratin and vimentin (CK + Vim) co-expression and beta-III tubulin (TUBB3) expression. Roman numerals indicate group numbers

культуры Mel Me с низкой экспрессией TUBB3 (18 %) и высоким уровнем коэкспрессии ЦК + Вим (74 %). Из 3-й подгруппы представлены результаты для клеток линии Mel H, в которых высокий уровень экспрессии TUBB3 (66 %) сочетается с умеренным показателем коэкспрессии ЦК + Вим (39 %). От других культур отличалась культура клеток первичной увеальной меланомы 92-1, в которой при высоком уровне экспрессии TUBB3 (65 %) не выявлена *de novo* экспрессия ЦК.

Следует отметить важную деталь. При иммунофлуоресцентном окрашивании культур, представленных на рис. 3, отчетливо видна экспрессия специфического мезенхимального белка Вим во всех клетках (верхний левый квадрант в диаграммах «Вим»). В то же время уровень экспрессии ЦК в разных культурах различается, и в 100 % случаев *de novo* экспрессия ЦК выявляется в клетках меланомы только в коэкспрессии с конститутивным мезенхимальным белком Вим (верхний и нижний квадранты в диаграммах «ЦК + Вим»). Аналогичные результаты получены при исследовании всех культур, включенных в сформированную панель клеток меланомы.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время одним из трендов, направленных на повышение эффективности лекарственной терапии опухолей разного генеза, в том числе меланом, является разработка новых классов противоопухолевых препаратов, в частности так называемых мигростатиков, нацеленных на снижение метастатического потенциала опухолевых клеток [2]. Отметим, что скрининг химических соединений — потенциальных претендентов на создание новых лекарств — начинается с экспериментов *in vitro*, поэтому формирование панелей клеточных культур разного генеза, охарактеризованных по экспрессии тех или иных

мишеней новых препаратов, является неотъемлемой частью подобного рода исследований.

В работе сформирована панель клеточных культур меланомы, которые охарактеризованы по количественным показателям экспрессии важнейшей потенциальной точки приложения мигростатиков — промежуточных филаментов ЦК и белка микротрубочек TUBB3. Согласно результатам фундаментальных исследований, экспрессия ЦК увеличивает миграционную активность клеток меланомы *in vitro* [4–7], а в клинических исследованиях показано, что *de novo* экспрессия ЦК в клетках меланомы повышает агрессивность течения этого заболевания [8, 9]. Что касается белка TUBB3, уже получены экспериментальные данные, согласно которым препараты, нацеленные на микротрубочки, могут быть использованы как мигростатики [20, 21], и эффективность некоторых из них уже оценивается в клинических исследованиях [22].

De novo экспрессия ЦК выявлена в 20 культурах клеток из 21 культуры меланом, из которых 18 культур получены из метастазов опухоли в лимфатические узлы, мягкие ткани или подкожно. И только в культуре 92-1, полученной из первичной увеальной меланомы, ЦК не экспрессировались. Следует отметить, что ЦК выявлены в клетках меланомы только в коэкспрессии с конститутивным белком меланомы Вим. По уровню коэкспрессии ЦК + Вим клетки различались значительно, и это позволяет использовать пары культур «высокая экспрессия маркера — низкая экспрессия маркера» для выявления как ингибирующего, так и стимулирующего воздействия на экспрессию ЦК при скрининге и изучении новых мигростатиков.

Что касается белка TUBB3, его экспрессия, как и Вим, выявлена в 100 % исследованных культур меланомы. При этом в сформированную панель вошли

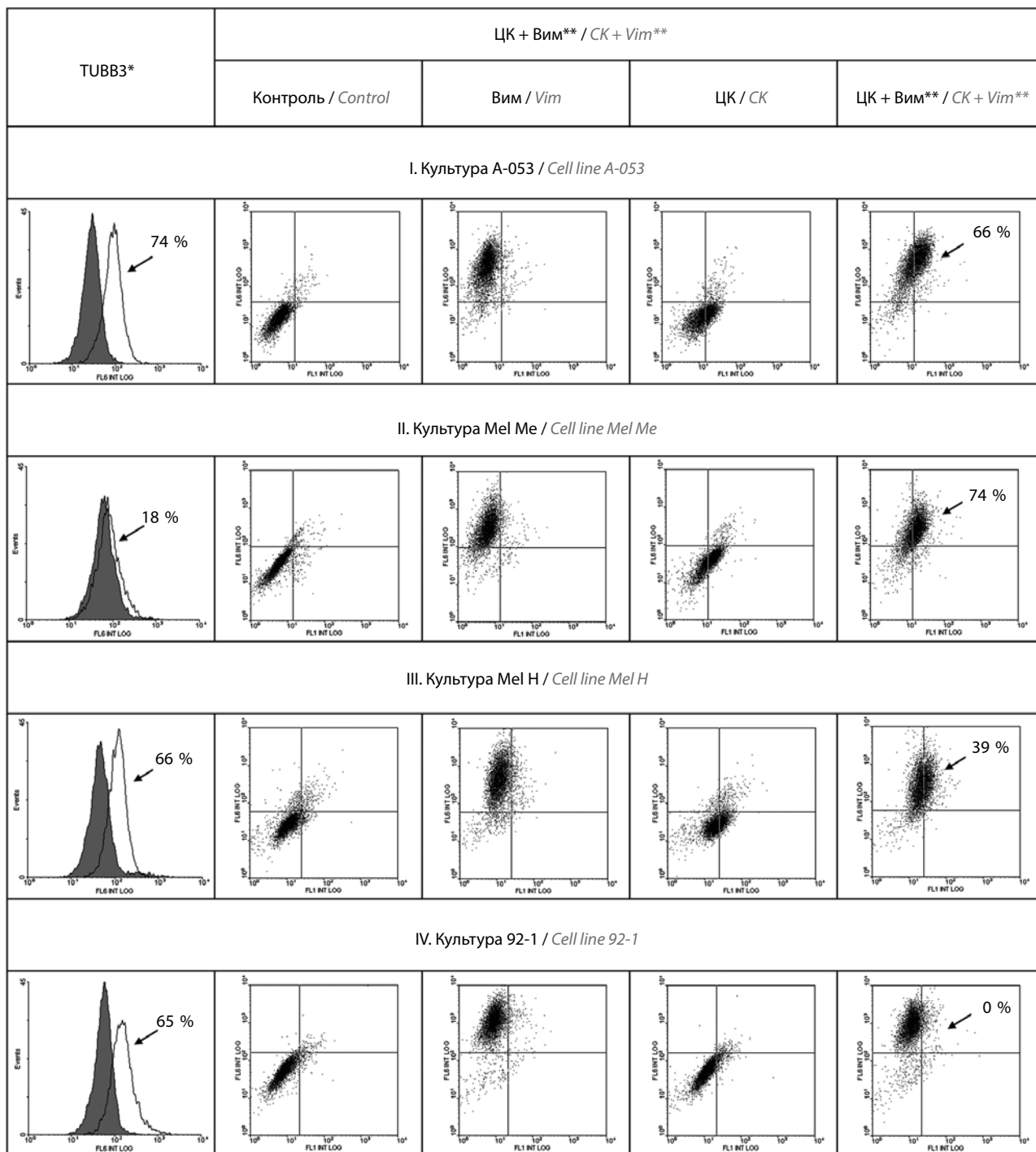


Рис. 3. Примеры результатов иммунофлуоресцентного анализа и проточной цитометрии культур клеток меланомы по уровню коэкспрессии цитокератинов и виментина (ЦК + Вим) и экспрессии бета-III тубулина (TUBB3). *Уровень экспрессии TUBB3: серые гистограммы – контроль (инкубация клеток только с вторичными антителами); белые – после инкубации с моноклональными антителами к TUBB3. По оси абсцисс – количество исследованных клеток; по оси ординат – интенсивность флуоресценции (y. e.). **Уровень экспрессии Вим, ЦК и коэкспрессии ЦК + Вим: по оси абсцисс – интенсивность внутриклеточной флуоресценции (y. e.) красителя DyLight 488; по оси ординат – DyLight 650. На диаграммах: контроль – autofлуоресценция клеток после инкубации с вторичными антителами (нижний левый квадрант); Вим – клетки, экспрессирующие Вим (левый верхний квадрант); ЦК – клетки, экспрессирующие ЦК (нижний правый квадрант); ЦК + Вим – клетки, коэкспрессирующие ЦК + Вим (верхний правый квадрант). Цифры указывают уровень экспрессии TUBB3 и коэкспрессии ЦК + Вим (%)

Fig. 3. Examples of the results of immunofluorescent analysis and flow cytometry of melanoma cell lines by the level of cytokeratin and vimentin (CK + Vim) co-expression and beta-III tubulin (TUBB3) expression. *TUBB3 expression level: gray histograms are control (incubation of cells with secondary antibodies only); white ones are after incubation with monoclonal antibodies to TUBB3. The abscissa shows the number of examined cells; along the y-axis, fluorescence intensity (a. u.). **The level of expression of Vim, CK and CK + Vim co-expression: abscissa and ordinate show the intensity of intracellular fluorescence (a. u.) of the dyes DyLight 488 and DyLight 650 respectively. On the diagrams: control is autofluorescence of cells after incubation with secondary antibodies (lower left quadrant); Vim – cells expressing Vim (upper left quadrant); CK – cells expressing CK (lower right quadrant); CK + Vim – cells co-expressing CK + Vim (upper right quadrant). The numbers indicated the level of TUBB3 expression and CK + Vim co-expression

культуры как с низким, так и с высоким уровнем экспрессии TUBB3. Изучение на парах таких культур новых соединений позволит выявить стимулирующий и ингибирующий эффекты потенциального миграстатика. При этом обнаружение ингибирующего воздействия будет указывать на «двойной» позитивный эффект нового соединения: как ингибитора метастатической активности клеток, так и резистентности к таксанам, поскольку известно, что резистентность клеток меланомы к препаратам таксанового ряда коррелирует с высокой экспрессией TUBB3 [15, 23].

И наконец, следует отметить разнообразность молекулярных фенотипов культур меланомы, включенных в сформированную панель. Клетки с разным соотношением экспрессии исследованных маркеров могут быть интересны с точки зрения выявления особенностей воздействия новых соединений не только на экспрессию белков цитоскелета, но и на резистентность клеток к таксанам. Представляют интерес и ответы на фундаментальные вопросы о различиях биологических характе-

ристик клеток с разным соотношением экспрессии белков цитоскелета, например, по их ростовым характеристикам в культуре и при трансплантации животным, по степени морфологической дифференцировки и т.д.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сформирована панель, включающая 21 культуру клеток меланомы человека из коллекции ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, в которых количественно охарактеризована экспрессия белков цитоскелета, ответственных за миграционную активность опухолевых клеток, — промежуточных филаментов ЦК и белка микротрубочек TUBB3. Группы культур с разным соотношением показателей экспрессии этих маркеров могут быть использованы для скрининга и доклинической оценки потенциальных миграстатиков, которые уменьшают метастатический потенциал меланомы и способны снижать резистентность к таксанам.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Skudalski L., Waldman R., Kerr P.E., Grant-Kels J.M. Melanoma: an update on systemic therapies. *J Am Acad Dermatol* 2022;86(3):515–24. DOI: 10.1016/j.jaad.2021.09.075
- Gandalovičová A., Rosel D., Fernandes M. et al. Migrastatics-anti-metastatic and anti-invasion drugs: promises and challenges. *Trends Cancer* 2017;3(6):391–406. DOI: 10.1016/j.trecan.2017.04.008
- Maiques O., Fanshawe B., Crosas-Molist E. et al. A preclinical pipeline to evaluate migrastatics as therapeutic agents in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 2021;125(5):699–713. DOI: 10.1038/s41416-021-01442-6
- Chu Y.W., Seftor E.A., Romer L.H., Hendrix M.J. Experimental coexpression of vimentin and keratin intermediate filaments in human melanoma cells augments motility. *Am J Pathol* 1996;148(1):63–9.
- Hendrix M.J., Seftor E.A., Chu Y.W. et al. Coexpression of vimentin and keratins by human melanoma tumor cells: correlation with invasive and metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1992;84(3):165–74. DOI: 10.1093/jnci/84.3.165
- Hendrix M.J., Seftor E.A., Seftor R.E. et al. Biologic determinants of uveal melanoma metastatic phenotype: role of intermediate filaments as predictive markers. *Lab Invest* 1998;78(2):153–63.
- Zhang K., Liang Y., Zhang W. et al. KRT81 knockdown inhibits malignant progression of melanoma through regulating interleukin-8. *DNA Cell Biol* 2021;40(10):1290–7. DOI: 10.1089/dna.2021.0317
- Han W., Hu C., Fan Z.J., Shen G.L. Transcript levels of keratin 1/5/6/14/15/16/17 as potential prognostic indicators in melanoma patients. *Sci Rep* 2021;11(1):1023. DOI: 10.1038/s41598-020-80336-8
- Plotzke J.M., Zhao R., Hrycaj S.M. et al. Immunohistochemical expression of PAX8, PAX2, and cytokeratin in melanomas. *J Cutan Pathol* 2021;48(10):1246–51. DOI: 10.1111/cup.14041
- Plaza J.A., Suster D., Perez-Montiel D. Expression of immunohistochemical markers in primary and metastatic malignant melanoma: a comparative study in 70 patients using a tissue microarray technique. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007;15(4):421–5. DOI: 10.1097/PAI.0b013e318032ea5d
- Ben-Izhak O., Stark P., Levy R. et al. Epithelial markers in malignant melanoma. A study of primary lesions and their metastases. *Am J Dermatopathol* 1994;16(3):241–6. DOI: 10.1097/00000372-199406000-00003
- Safadi R.A., Bader D.H., Abdullah N.I., Sughayer M.A. Immunohistochemical expression of keratins 6, 7, 8, 14, 16, 18, 19, and MNF-116 pancytokeratin in primary and metastatic melanoma of the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2016;121(5):510–9. DOI: 10.1016/j.oooo.2015.11.016
- Altonsy M.O., Ganguly A., Amrein M. et al. Beta3-tubulin is critical for microtubule dynamics, cell cycle regulation, and spontaneous release of microvesicles in human malignant melanoma cells (A375). *Int J Mol Sci* 2020;21(5):1656. DOI: 10.3390/ijms21051656
- Orfanidis K., Wäster P., Lundmark K. et al. Evaluation of tubulin β -3 as a novel senescence-associated gene in melanocytic malignant transformation. *Pigment Cell Melanoma Res* 2017;30(2):243–54. DOI: 10.1111/pcmr.12572
- Akasaka K., Maesawa C., Shibasaki M. et al. Loss of class III beta-tubulin induced by histone deacetylation is associated with chemosensitivity to paclitaxel in malignant melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2009;129(6):1516–26. DOI: 10.1038/jid.2008.406
- Shimizu A., Kaira K., Yasuda M. et al. Decreased expression of class III β -tubulin is associated with unfavourable prognosis in patients with malignant melanoma. *Melanoma Res* 2016;26(1):29–34. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000208
- Мамичев И.А., Богущ Т.А., Богущ Е.А. и др. Белок микротрубочек β III-тубулин: строение, экспрессия и функции в нормальных и опухолевых клетках. *Антибиотики и химиотерапия* 2018;63(7–8):79–90.
- Mamichev I.A., Bogush T.A., Bogush E.A. et al. Microtubule protein β III-tubulin: structure, expression and functions in normal and tumor cells. *Antibiotiki i himioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy* 2018;63(7–8):79–90. (In Russ.).
- Bogush T.A., Basharina A.A., Safarov Z.M. et al. Molecular diagnostics of the involvement of visually normal mucosa in the

- malignancy process in urothelial bladder cancer. *Mol Biol* 2022;56:592–9. DOI: 10.1134/S0026893322040033
19. Bogush T.A., Basharina A.A., Eliseeva B.K. et al. A new approach to epithelial-mesenchymal transition diagnostics in epithelial tumors: double immunofluorescent staining and flow cytometry. *Biotechniques* 2020;69(4):257–63. DOI: 10.2144/btn-2020-0024
 20. Kralova V., Hanušová V., Caltová K. et al. Flubendazole and mebendazole impair migration and epithelial to mesenchymal transition in oral cell lines. *Chem Biol Interact* 2018;293:124–32. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.07.026
 21. Meco D., Attinà G., Mastrangelo S. et al. Emerging perspectives on the antiparasitic mebendazole as a repurposed drug for the treatment of brain cancers. *Int J Mol Sci* 2023;24(2):1334. DOI: 10.3390/ijms24021334
 22. Rebastinib plus antitubulin therapy with paclitaxel or eribulin in metastatic breast cancer. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02824575>
 23. Mhaidat N.M., Thorne R.F., de Bock C.E. et al. Melanoma cell sensitivity to Docetaxel-induced apoptosis is determined by class III beta-tubulin levels. *FEBS Lett* 2008;582(2):267–72. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.12.014

Благодарность. Авторы благодарят М.А. Маяк за помощь в проведении иммунофлуоресцентного анализа.

Acknowledgement. The authors thank M.A. Maiak for assistance with immunofluorescence analysis.

Вклад авторов

Т.А. Богуш: идея, обработка полученных данных, написание текста статьи;
И.Э. Мизаева: проведение иммунофлуоресцентного анализа, обработка полученных данных;
А.А. Башарина: обработка полученных данных, написание текста статьи;
А.Н. Гришанина: подготовка одноклеточных суспензий культур клеток;
М.А. Барышникова: культивирование клеток, написание текста статьи, научное редактирование;
О.С. Бурова, А.А. Рудакова: культивирование клеток, подготовка клеток к анализу;
В.С. Косоруков: идея, научное редактирование, общее руководство работой.

Authors' contribution

T.A. Bogush: idea, processing the data, article writing;
I.E. Mizaeva: conducting immunofluorescent analysis, processing the data;
A.A. Basharina: processing the data, article writing;
A.N. Grishanina: preparation of single-cell suspensions of cell cultures;
M.A. Baryshnikova: cell cultivation, article writing, scientific editing;
O.S. Burova, A.A. Rudakova: cell cultivation, preparation of cells for analysis;
V.S. Kosorukov: idea, scientific editing, general work management.

ORCID авторов / ORCID of authors

Т.А. Богуш / T.A. Bogush: <https://orcid.org/0000-0002-7673-4284>
И.Э. Мизаева / I.E. Mizaeva: <https://orcid.org/0000-0002-3338-9679>
А.А. Башарина / A.A. Basharina: <https://orcid.org/0000-0002-4739-7733>
А.Н. Гришанина / A.N. Grishanina: <https://orcid.org/0000-0002-4277-9222>
М.А. Барышникова / M.A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>
О.С. Бурова / O.S. Burova: <https://orcid.org/0000-0001-8897-0172>
А.А. Рудакова / A.A. Rudakova: <https://orcid.org/0000-0001-7266-7689>
В.С. Косоруков / V.S. Kosorukov: <https://orcid.org/0000-0002-8462-2178>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение о субсидии № 075-15-2021-1060 от 28.09.2021) и в рамках научно-исследовательской работы ФГБУ «Национальный медицинский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России 2023–2025 гг. (регистрационный № 123021500076-3).

Funding. The work was carried out with the support of the Ministry of Science and Higher Education of Russia (subsidy agreement No. 075-15-2021-1060, september 28, 2021) and the research project of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of 2023–2025 (No. 123021500076-3).

Статья поступила: 13.04.2023. **Принята к публикации:** 24.07.2023.

Article submitted: 13.04.2023. **Accepted for publication:** 24.07.2023.