#### МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

На правах рукописи

Кутова Ольга Михайловна

# Роль межклеточных контактов в формировании резистентности опухолевых сфероидов к терапевтическим воздействиям

1.5.2. – Биофизика

# ДИССЕРТАЦИЯ на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель: к.б.н., доц. Балалаева Ирина Владимировна доцент каф. биофизики ИББМ ННГУ им. Н.И. Лобачевского

Нижний Новгород - 2022

# ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	9
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1. Структура и функции контактов клетка-клетка и клетка-матрикс	16
1.1.1. Типы контактов клетка-клетка и клетка-матрикс	16
1.1.2. Адгезивные контакты	16
1.1.3. Плотные контакты	20
1.1.4. Десмосомы	22
1.1.5. Щелевые контакты	24
1.1.6. Контакты клетка-внеклеточный матрикс	25
1.2. Роль клеточных контактов в регуляции пролиферации и миграции клеток	28
1.2.1. Роль белков клеточных контактов в регуляции пролиферации	28
1.2.2. Роль белков клеточных контактов в регуляции миграции	32
1.3. Роль белков контактов в развитии опухолей	35
1.3.1. Участие белков адгезивных контактов в определении фенотипа опухолевых клеток и формировании контактов с клетками стромы 1.3.2. Участие белков плотных контактов в формировании фенотипа	35
опухолевых клеток 1.3.3. Участие белков десмосом в формировании фенотипа опухолевых клеток	38
1.3.4. Участие щелевых контактов в формировании микроокружения опухоли	42
1.3.5. Участие контактов клетка-матрикс в формировании микроокружения опухоли	45
1.3.6. Перекрестные взаимодействия разных типов контактов	46
1.3.7. Перекрестные взаимодействия белков контактов с HER2	47
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	51
2.1. Клеточные линии	51
2.2. Получение сфероидов и их характеристика	51

2.3. Получение моделей опухоли <i>in vivo</i> 53
2.4. Получение рекомбинантного таргетного токсина DARPin-LoPE53
2.5. Аутентификация DARPin-LoPE
2.6. Анализ цитотоксичности DARPin-LoPE и доксорубицина56
2.7. Флуоресцентное мечение DARPin-LoPE и БСА
2.8. Оценка глубины проникновения доксорубицина, DARPin-LoPE и БСА в
сфероид
2.9. Анализ представленности белков межклеточных контактов, виментина,
интегрина β1 и рецептора HER259
ГЛАВА З. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ
3.1. Получение трехмерной модели аденокарциномы яичника in vitro
монослойной культуры и сфероидов <i>in vitro</i>
3.3. Анализ глубины и динамики проникновения DARPin-LoPE, БСА и
доксорубицина в сфероид69
3.4. Анализ участия рецептора HER2 в формировании устойчивости
опухолевых клеток в трехмерной структуре75
3.5. Профиль экспрессии белков контактов в моделях опухолевого роста in
<i>vitro</i> 77
3.6. Профиль экспрессии белков контактов в экспериментальных опухолях
<i>in vivo</i> 85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ91
ВЫВОДЫ
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ97

# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВКМ – внеклеточный матрикс

ДМЕМ – модифицированная Дульбекко среда Игла, (от англ. Dulbecco's modified

Eagles medium)

ДМСО – диметилсульфоксид

ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид

ММП – матриксная металлопротеиназа

МЭП – мезенхимально-эпителиальный переход

МО – микроокружение опухоли

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

АВС – АТФ-связывающая кассета (от англ. ATP-binding cassette)

APC – аденоматозный полипоз кишечной палочки (от англ. adenomatous polyposis coli)

Arp2/3 – родственные актину белки 2/3 (от англ. actin related protein 2/3)

ATR – атаксия-телеангиэктазия и Rad3-родственный белок (от англ. ataxia, telangiectasia and Rad3-related protein)

Bax – X белок, ассоциированный с Bcl-2 (от англ. Bcl-2 associated X protein)

Bcl-2 – белок В-клеточной лимфомы 2 (от англ. B-cell lymphoma 2)

BMI1 – гомолог региона вставки Mo-MLV В-клеточной лимфомы 1 (от англ. В lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog)

BPAG – антиген буллезного пемфигоида 1 (от англ. bullous pemphigoid antigen 1)

c-Abl – вирус мышиного лейкоза Абельсона (от англ. Abelson murine leukemia virus)

CDK2 – циклин-зависимая киназа 2 (от англ. cyclin-dependent kinase 2)

CDKN1B – ингибитор циклин-зависимой киназы 1В (от англ. cyclin-dependent kinase inhibitor 1В)

CKI/GSK-3 – ингибитор циклин-зависимой киназы / киназа гликоген-синтазы 3 (от англ. cyclin-dependent kinase inhibitor / glycogen synthase kinase 3)

c-Met – клеточный фактор мезенхимально-эпителиального перехода (от англ. cellular mesenchymal-epithelial transition factor)

с-МҮС – клеточный миелоцитоматоз (от англ. cellular myelocytomatosis)

DARPin – белок, сконструированный на основе анкириновых повторов (от англ. designed ankyrin repeat protein)

DISC – индуцирующий смерть клетки сигнальный комплекс (от англ. death induced silencing complex)

DR4/DR5 – рецептор смерти (от англ. death receptor 4 и 5)

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста (от англ. epidermal growth factor receptor)

Erk – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами (от англ. extracellular signalregulated kinase)

FAK – киназа фокальной адгезии (от англ. focal adhesion kinase)

FGFR – рецептор фактора роста фибробластов (от англ. fibroblast growth factor receptor)

FITC – изотиоцианат флуоресцеина (от англ. fluorescein isothiocyanate)

GEF – фактор гуанинового обмена (от англ. guanine exchange factor)

HER2 – человеческий рецептор эпидермального фактора роста 2 (от англ. human epidermal growth factor receptor 2)

Hippo – протеин-киназа «гиппопотам» (от англ. hippopotamus)

IC50-полумаксимальная ингибирующая концентрация

IGF-IR1 – рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (от англ. insulin-like growth factor 1)

JAM – соединительная молекула адгезии (от англ. junctional adhesion molecule)

КDEL – последовательность аминокислот лизин-аспарагиновая кислотаглутаминовая кислота-лейцин

LATS1 – большая супрессорная киназа опухолей 1 (от англ. large tumor suppressor)

LEF/TCF – лимфоидный фактор, связывающийся с энхансером / Т-клеточный фактор (от англ. lymphoid enhancer-binding factor / T-cell factor)

LoPE – низкоиммуногенный псевдомонадный экзотоксин (от англ. low-immunogenic *Pseudomonas* exotoxin)

LRP – белок, родственный рецептору липопротеинов низкой плотности (от англ. low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein)

MARVEL – (миелин и белок лимфоцитов) и родственные белки для переноса везикул и связи с мембраной (от англ. MAL (myelin and lymphocyte protein) and related proteins for vesicle trafficking and membrane link)

MCP1 – белок-хемоаттрактант моноцитов 1 (от англ. monocyte chemoattractant protein-1)

MEK – киназа митоген-активируемой протеинкиназы (от англ. mitogen-activated protein kinase kinase)

MPDZ – белок с множественными доменами PDZ (от англ. multiple PDZ domain protein)

mTOR – мишень рапамицина млекопитающих (от англ. mammalian target of rapamycin)

MTT – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (от англ. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

MUPP – белок с множественными PDZ-доменами-1 (от англ. multi-PDZ domain protein-1)

Nanog – транскрипционный фактор, название образовано от ирландского Tír na nÓg (мифическая земля вечной юности)

NF-кВ – ядерный фактор «каппа-би» (от англ. nuclear factor kappa-light-chainenhancer of activated B cells)

NRF2 – ядерный фактор, связанный с эритроидным фактором 2, фактор 2 (от внгл. nuclear factor erythroid 2-related factor 2)

Oct4 – октамер-связывающий фактор транскрипции 4 (от англ. octamer-binding transcription factor 4)

p38MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа p38 (от англ. p38 mitogen-activated protein kinase)

PDGFR – рецептор фактора роста тромбоцитов (от англ. platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$ )

PDK1 – киназа 1 пируватдегидрогеназы (от англ. pyruvate dehydrogenase kinase 1)

PDZ – белок постсинаптической плотности (PSD95), большой супрессор опухоли диска дрозофилы (Dlg1) и zonula occludens-1 (от англ. Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), and Zonula occludens-1)

PI3K/Akt – фосфоинозитид-3-киназа (PI3k) / протеинкиназа В альфа (от англ. phosphoinositide 3-kinase / RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, protein kinase B alpha)

РКС $\varepsilon$  – протеинкиназа С  $\varepsilon$  (от англ. protein kinase С $\varepsilon$ )

PTEN – гомолог фосфатазы и тензина делетирован на хромосоме 10 (от англ. phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10)

PUMA – p53-активируемый модулятор апоптоза (от англ. p53 upregulated modulator of apoptosis)

Rac – субстрат ботулинического токсина C3, связанный с Ras (от англ. Ras-related C3 botulinum toxin substrate)

Rap1 – Ras проксимат-1 (от англ. Ras-proximate-1)

Ras – вирус саркомы крыс (от англ. rat sarcoma virus)

Rho – член семьи гомологов Ras (от англ. Ras homolog family member)

SDS – додецилсульфат натрия (от англ. sodium dodecyl sulphate)

SLUG – белок с цинковым пальцем SNAI2 (от англ. Zinc finger protein SNAI2)

SOX2 – область определения пола Y-box 2 (от англ. sex determining region Y-box 2)

SPARC – секретируемый белок, кислый и богатый цистеином (от англ. secreted protein, acidic and rich in cysteine)

Src – саркома Раусса (от англ. Rous sarcoma)

TAZ – транскрипционный ко-активатор, несущий мотив, связывающий PDZ (от англ. transcriptional co-activator with PDZ-binding motif)

TBS – буферный раствор на основе трис (от англ. tris buffer solution)

TEAD – транскрипционный усиленный вспомогательный домен (от англ. transcriptional enhanced associate domain)

ТGF $\beta$  – трансформирующий фактор роста  $\beta$  (от англ. transforming growth factor  $\beta$ )

TRAIL – лиганд, зависимый от фактора некроза опухолей, индуцирующий апоптоз (от англ. tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)

TWIST – белок, содержащий основной мотив «спираль-петля-спираль», класса A (от англ. class A basic helix–loop–helix protein 38)

VASP – стимулируемый вазодилататорами фосфопротеин (от англ. vasodilatorstimulated phosphoprotein)

VEGF – эндотелиальный фактор роста сосудов (от англ. vascular endothelial growth factor)

Wnt – бескрылый, интеграция 1 (от англ. W (wingless) и Int (integration 1))

YAP – белок ассоциированный с Yes (от англ. Yes-associated protein)

YES – киназа, кодируемая геном Yes

YTPS – дрожжи, триптон, фосфат, натрий (от англ. yeast, triptone, phosphate, sodium)

ZEB1 – связывающий Е-бокс цинкового пальца гомеобокс 1 (от англ. zinc finger E-box-binding homeobox 1)

ZO – zonula occludens

ZONAB – белок, связывающий нуклеиновые кислоты, ассоциированный с ZO-1 (от англ. ZO-1-associated nucleic acid binding protein)

 $\lambda_{ex}$  – длина волны возбуждающего света

λет- диапазон регистрации флуоресценции

#### введение

#### Актуальность исследования

Формирование лекарственной устойчивости злокачественных опухолей вызывает необходимость пересмотра и оптимизации современных подходов к лечению. Решение такой задачи требует детального изучения механизмов лекарственной устойчивости, работающих на разных уровнях организации опухоли. Одно из центральных мест в изучении биологии опухолей и характера их ответа на терапию на сегодняшний день отводится особенностям трехмерной структуры опухолевой ткани.

Нормальное формирование и функционирование тканей в многоклеточном организме зависит от скоординированной регуляции количества клеток, степени их дифференцировки, их морфологии и взаимного расположения. Такая координация за счет сложной сети связей между клетками, поддерживается где ИХ физиологические функции регулируются набором сигналов, получаемых клеткой от соседних клеток и внеклеточной среды. Непосредственное взаимодействие клеток между собой и внеклеточным матриксом реализуется за счет белковых комплексов межклеточных контактов (адгезивных, плотных, щелевых контактов и десмосом) и контактов клетка-матрикс (фокальных контактов и полудесмосом), занимающих одно из центральных мест в путях внутриклеточной сигнализации [1,2]. Нарушение скоординированной работы белков контактов в нормальной ткани может вести к созданию условий, способствующих злокачественной трансформации. В опухолевой ткани совокупность перекрестных взаимодействий опухолевых клеток, клеток стромы и внеклеточного матрикса, а также сопутствующих специфических физикохимических условий создает так называемое микроокружение опухоли (MO) [3], в пределах которого работа белков контактов служит успешному приспособлению малигнизированных клеток к условиям среды. В основе этого приспособления лежит способность опухолевых клеток претерпевать эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), который позволяет клеткам мигрировать и обеспечивает как

инвазию в близлежащие к опухоли ткани, так и процесс метастазирования. Для успешного заселения дальних метастатических ниш опухолевые клетки должны претерпеть обратный процесс – мезенхимально-эпителиальный переход (МЭП) [4,5]. В последнее время накапливается множество сведений, подтверждающих, что процесс ЭМП-МЭП не бинарен, и опухолевые клетки демонстрируют высокую фенотипическую пластичность, которая во многом и обусловливает успешное прогрессирование опухоли, ее рецидив после лечения и развивающуюся лекарственную устойчивость [6,7].

Показано, что устойчивость опухолей может быть обусловлена невозможностью взаимодействия противоопухолевого агента с его мишенью или, при успешном взаимодействии, – нарушением последующей эффекторной цепи событий. Невозможность взаимодействия агента и мишени, в свою очередь, может быть обусловлена на генетическом уровне за счет потери или модификации мишени из-за анеуплоидии опухолевых клеток, их геномной нестабильности, мутаций и амплификаций генов, отвечающих за контроль пролиферации, миграции и дифференцировки, усиления процессов репарации ДНК, нарушения эпигенетической регуляции. На уровне клетки устойчивость может реализовываться за счет препятствования проникновению терапевтического агента в клетку, активной его «выкачки», секвестрации, или метаболизации [8,9]. Затруднение проникновения через мембрану может быть связано с изменениями ее липидного состава [10], выкачка терапевтических агентов различной природы из клетки осуществляется с помощью белков множественной лекарственной устойчивости из класса ABC<sup>1</sup>транспортеров [11], секвестрация (изолирование агента от внутриклеточной мишени) осуществляться инкапсулированием В [12], может лизосомы а метаболизация происходит за счет включения ферментных систем нейтрализации ксенобиотиков [13]. Следует отметить, что в опухоли могут также создаваться условия, препятствующие ee уничтожению иммунной системой за счет

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> ABC – от англ. ATP-binding cassette – АТФ-связывающая кассета

предотвращения инфильтрации цитотоксических иммунных клеток или подавления их активности [14], а также усиливающие пролиферативный и инвазивный потенциал опухоли за счет привлечения иммунных клеток, в норме отвечающих за регенерацию ткани [15]. Эти факторы, совместно с иммунорезистентностью, характерной для самих опухолевых клеток, еще более осложняют лечение, в том числе и с помощью иммунотерапии [16]. Показано, что данные механизмы запускаются или усиливаются на фоне ЭМП [17,18].

Процесс ЭМП сопряжен с перестройкой адгезивного поведения клетки в целом и, соответственно, с изменениями состава и уровней представленности белков адгезии [6]. Изучение механизмов, связывающих изменения в профиле представленности белков адгезии и возникновение лекарственной устойчивости, таким образом, откроет перспективы создания более совершенных терапевтических агентов и подходов к лечению.

#### Цели и задачи исследования

Целью данной работы было исследование механизмов формирования лекарственной устойчивости опухоли с участием межклеточных контактов на примере сфероидов аденокарциномы яичника с гиперэкспрессией онкомаркера HER2.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- Провести сравнительный анализ эффективности терапевтических агентов различной молекулярной массы на монослойной культуре и опухолевых сфероидах.
- 2. На модели опухолевых сфероидов определить глубину проникновения терапевтических агентов различной молекулярной массы.
- Проанализировать уровень экспрессии рецептора-мишени на опухолевых клетках в разных условиях культивирования как возможный фактор изменения резистентности опухолей к таргетной терапии.

- 4. Провести экспрессии белков анализ взаимосвязи между уровнем межклеточных контактов И резистентностью опухолевых клеток К терапевтическим воздействиям при переходе к трехмерному культивированию in vitro.
- 5. Проанализировать сопоставимость профиля экспрессии белков межклеточных контактов в сфероидах *in vitro* и ксенографтных моделях опухоли *in vivo*.

#### Научная новизна

Получены сфероиды для ряда линий клеток аденокарциномы яичника человека и охарактеризованы их ростовые и морфологические особенности.

Определена глубина проникновения терапевтических агентов различной молекулярной массы в сфероид и показано, что для высокомолекулярного агента она не превышает 70 мкм, выступая, таким образом, как один из факторов развития устойчивости.

Впервые проведено комплексное исследование белков-представителей всех типов межклеточных контактов при формировании трехмерной структуры клетками аденокарциномы яичника. Установлено, что в клетках исследуемых линий отсутствует белок адгезивных контактов, эпителиальный маркер, Е-кадгерин. Наибольшая представленность была обнаружена для белка щелевых контактов коннексина-43. В клетках аденокарциномы яичника с более выраженным метастатическим потенциалом было выявлено статистически значимое более высокое содержание белка десмосом десмоглеина-2. В целом, при переходе к трехмерному культивированию было выявлено снижение представленности большинства исследованных в работе белков межклеточных контактов.

Продемонстрировано, что профиль представленности белков межклеточных контактов в сфероидах на основе клеток аденокарциномы яичника линий SKOV-3 и SKOV-3.ip до некоторой степени отражает таковой в модели опухоли *in vivo*, однако имеются значимые отличия между моделями.

#### Научно-практическая значимость

Получены новые знания о вкладе трехмерной структуры опухолей, в частности, межклеточной адгезии, в развитие устойчивости опухолей к терапевтическим воздействиям. Результаты диссертационного исследования могут быть использованы при создании новых противоопухолевых агентов и разработке подходов к лечению онкологических заболеваний для преодоления устойчивости опухолей с учетом ее комплексной природы.

Основные выводы и результаты работы будут использованы в учебном процессе в рамках курсов для студентов ННГУ им. Н.И. Лобачевского, обучающихся по биологическим и медицинским специальностям.

#### Основные положения, выносимые на защиту

- 1. При переходе к трехмерному культивированию клетки аденокарциномы яичника человека приобретают устойчивость к терапевтическим агентам различной природы: цитостатическому антибиотику доксорубицину и рекомбинантному HER2-специфичному таргетному токсину DARPin-LoPE.
- Глубина проникновения высокомолекулярного противоопухолевого таргетного токсина белковой природы в сфероиды не превышает 70 мкм, что может выступать как фактор формирования устойчивости сфероидов к его действию.
- 3. При переходе к трехмерной организации опухолевых клеток в условиях *in vitro* происходит снижение представленности белков-представителей межклеточных контактов. Потеря межклеточной адгезии может служить маркером эпителиально-мезенхимального перехода и свидетельствует о приобретении клетками более агрессивного фенотипа.

#### Личный вклад автора

Автор лично участвовал в проведении работы на всех этапах её выполнения, включая постановку задач, планирование и проведение экспериментов, обработку и

интерпретацию полученных результатов. Совместно с соавторами автор принимал участие в подготовке научных статей и докладов на семинарах и конференциях.

#### Достоверность научных результатов

Надежность используемых методов исследования вместе с воспроизводимостью результатов подтверждает достоверность научных результатов. Кроме того, аргументы и выводы, основанные на научных результатах, совпадают с результатами независимых исследований в литературе.

#### Апробация

Основные результаты работы были представлены на международных и российских научных мероприятиях: III научно-практической конференции «Исследования и разработки – 2016» (Москва, 2016); Ш Всероссийском научном форуме «Наука будущего – наука молодых» (Нижний Новгород, 2017); XVI Курчатовской междисциплинарной молодежной научной школе (Москва, 2019); Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2018, 2019, 2020); Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века» (Пущино, 2020); 11-ой Международной конференции «Рецепторы внутриклеточная сигнализация» (Пущино, 2021); 45-ом И Международном конгрессе FEBS (Любляна, Словения, 2021); 7-ой Международной электронной конференции по медицинской химии (Базель, Швейцария, 2021).

#### Публикации

По материалам диссертации опубликовано 24 работы, включая 7 статей в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus, РИНЦ), входящих в список ВАК.

#### Структура и объем работы

Работа состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материалов и методов работы, описания результатов и их обсуждения, заключения, выводов, цитируемой литературы. Объем составляет 142 страницы машинописного

текста, иллюстрированного 21 рисунком и 1 таблицей. Список литературы включает 338 источников.

## Благодарности

Диссертационное исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ (проекты № 17-74-10227 и 19-74-20168) и РФФИ (проекты № 17-00-00122 и 19-34-90159).

#### ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Структура и функции контактов клетка-клетка и клетка-матрикс

#### 1.1.1. Типы контактов клетка-клетка и клетка-матрикс

Нормальное формирование и функционирование тканей в многоклеточном организме зависит от скоординированной регуляции количества клеток, степени их дифференцировки, морфологии и взаимного расположения. Такая координация поддерживается за счет сложной сети связей между клетками, где физиологические функции каждой клетки регулируются набором сигналов различной природы (электрических, механических, химических), получаемых от соседних клеток и внеклеточной среды. Восприятие этих сигналов опосредуется рецепторными молекулами на поверхности клетки или внутри нее. Молекулы, обеспечивающие физическую целостность ткани за счет адгезии клеток между собой и компонентами внеклеточного матрикса, участвуют также и в координации ткани, в значительной степени определяя тканеспецифичность [19]. Существует 4 типа межклеточных контактов: адгезивные, плотные, щелевые контакты и десмосомы. Связь клеток с матриксом осуществляется за счет фокальных контактов и внеклеточным полудесмосом. Структурно межклеточные контакты и контакты клетка-матрикс можно охарактеризовать как белковые комплексы, состоящие из интегральных мембранных белков, непосредственно обеспечивающих контакт, и системы адаптерных белков, за счет которых интегральный белок взаимодействует с компонентами цитоскелета [20]. Для эпителиальных тканей характерно четко организованное расположение всех указанных типов контактов (рис. 1). В данном разделе кратко описаны особенности строения и функционирования перечисленных типов контактов.



**Рис.1.** Схема расположения межклеточных контактов в эпителиальной ткани на примере простого эпителия. А - апикальный комплекс адгезии; Б – щелевые контакты; В – контакты клеткаматрикс. Микрофотографии заимствованы из [21-24]

#### 1.1.2. Адгезивные контакты

Адгезивные контакты обеспечивают механическую прочность ткани за счет скоординированного взаимодействия компонентов актинового цитоскелета соседних клеток. В эпителиальных тканях адгезивные контакты располагаются в виде пояса, охватывающего апикальные области клеток, с внутриклеточной стороны которого аналогично располагаются актиновые филаменты. Это обеспечивает целостность ткани и ее механическую прочность. Интегральные белки адгезивных контактов представлены белками из семейства кадгеринов, которые обеспечивают взаимодействие (25).

Кадгерины для которых была определена тканеспецифичность представлены эпителиальным Е-кадгерином, нейрональным N-кадгерином, плацентарным Р-кадгерином, сосудистым эндотелиальным VE-кадгерином. Они являются важными факторами морфогенеза и поддержания тканевого гомеостаза [26], регулируют пластичность ткани, контролируют прохождение растворенных веществ, воды и лимфоидных клеток [27]. Следует отметить, что интегральные белки десмосом десмоглеины и десмоколлины, которые будут подробно рассмотрены далее (п. 1.1.4.) также относятся к семейству кадгеринов [28].

Классические кадгерины представляют собой трансмембранные, кальцийбелки. 5 зависимые эктодомен которых характерных имеет иммуноглобулиноподобных субдоменов, а цитоплазматический домен несет 2 консервативных мотива [29,30]. Взаимодействие кадгеринов двух соседних клеток происходит за счет придания кривизны эктодоменам кадгерина при связывании трех ионов Ca<sup>2+</sup> с консервативными аминокислотами в районе линкерных участков таким образом, что длинные оси первого и пятого субдомена находятся почти под прямым углом, и первые субдомены молекул кадгерина соседних клеток устанавливают транс-взаимодействие [29,31]. В то же время идет кластеризация кадгерина на поверхности каждой клетки за счет цис-взаимодействий между соседними молекулами кадгерина, что в итоге дает соединение по принципу действия похожее на застежку-липучку (рис. 2) [32,33].

Взаимодействие кадгеринов с актиновым цитоскелетом осуществляется за счет адаптерных белков катенинов, в том числе β-катенина, α-катенина и p120 [34,35]. Цитоплазматический домен кадгерина взаимодействует с β-катенином, N-конец которого в свою очередь взаимодействует с α-катенином, связывающимся с F-актином, а p120 стабилизирует получившийся комплекс [34,36]. β-катенин является центральной молекулой передачи сигнала по пути Wnt<sup>2</sup>. В отсутствие сигнала, то

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Wnt – от англ. W (wingless) и Int (integration 1)) – общее название сигнального пути регуляции эмбриогенеза и дифференцировки клеток и лиганда, запускающего этот путь

есть связывания белков Wnt с комплексом рецептора Frizzled/LRP<sup>3</sup> уровень несвязанного β-катенина в цитоплазме поддерживается низким за счет его деградации в протеасомах.



**Рис. 2.** Схема организации адгезивного межклеточного контакта.

ВКД – внутриклеточный домен; ТМД – трансмембранный домен. Между кадгеринами соседних клеток (транс, красный) происходит взаимодействие между первыми субдоменами эктодоменов. Кластеризация кадгеринов каждой клетки (цис, желтый) происходит за счет взаимодействия между субдоменом 1 одной молекулы кадгерина и субдоменами 2-3 и линкерным участком между ними другой молекулы. ВКД кадгеринов взаимодействует с актиновым цитоскелетом через посредство адаптерных белков. Адаптировано по [37,38]

Связывание Wnt с его рецептором нарушает процесс деградации β-катенина, тем самым позволяя ему накапливаться в цитоплазме, транслоцироваться в ядро и активировать экспрессию генов-мишеней, в частности за счет связывания с транскрипционным фактором LEF/TCF<sup>4</sup> [39,40]. α-катенин не взаимодействует напрямую с кадгеринами, а связывается с N-концевой областью β-катенина и некоторыми другими актин-связывающими белками, в частности, выполняющими сигнальные функции, такими как формин-1, участвующий в регуляции актинового цитоскелета [27]. р120 связывается с цитоплазматическим доменом кадгерина и

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> LRP – от англ. low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein – белок, родственный рецептору липопротеинов низкой плотности

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> LEF/TCF – от англ. lymphoid enhancer-binding factor / T-cell factor – лимфоидный фактор, связывающийся с энхансером / Т-клеточный фактор

также участвует в регуляции жизненно важных процессов в клетке, в том числе и по пути Wnt [41], кроме того он может выступать субстратом протеинкиназы  $Src^{5}$  [40].

Кроме адгезионных комплексов на основе кадгерина в состав адгезивных контактов входят также комплексы на основе нектина – кальций-независимого иммуноглобулиноподобного белка, который соединяется с актиновым цитоскелетом через адаптерный белок афадин, связывающимся с α-катенином, тем самым обеспечивая и связь с кадгериновой компонентой адгезивных контактов [42]. Следует отметить, что функции выполняемые адгезивными контактами не определяются лишь основными их компонентами, но являются результатом многочисленных вариантов взаимодействий с различными компонентами цитоскелета и регуляторными белками [43].

#### 1.1.3. Плотные контакты

Плотные контакты представляют собой белковые комплексы, которые соединяют мембраны соседних клеток в виде тяжей и вносят основной вклад в барьерную функцию эпителия за счет ограничения и контроля парацеллюлярного транспорта [44]. Кроме того, они обеспечивают организацию липидной мембраны клетки: располагаясь на самой апикальной области клетки, они обеспечивают разграничение ее апикального и базолатерального доменов, таким образом участвуя [45,46]. Показано, поддержании полярности что В на ранних стадиях эмбрионального развития плотные контакты вносят значительный вклад в регуляцию дифференцировки клеток зародыша [47].

Наиболее важными структурными и функциональными компонентами плотных контактов являются белки семейства клаудинов. Они являются основными регуляторами парацеллюлярного транспорта ионов. Запирающие клаудины «сшивают» мембраны соседних клеток, ограничивая транспорт, в то время как канал-образующие клаудины отграничивают в парацеллюлярном пространстве

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Src – от англ. Rous sarcoma – нерецепторная тирозинкиназа, онкоген

каналы различной селективности, которая задается типом клаудина [48-50]. Характерная структура клаудинов представляет собой 4 трансмембранных домена, короткий N-конец и длинный C-конец имеют внутриклеточную локализацию. Сконец клаудинов несет на себе сайты связывания с PDZ<sup>6</sup>-мотивами адаптерных белков, сайты фосфорилирования и пальмитирования, а также ответственен за трафик клаудина к мембране [51]. Внеклеточные петли клаудина содержат высоконсервативные последовательности, которые определяют формирование плотного контакта. Цис-взаимодействие N-концевых петель соседних клаудинов одной клетки и транс-взаимодействие С-концевых петель клаудинов соседних клеток позволяет формирование соединения типа застежки-молнии [52]. Кроме того, консервативная последовательность первой внеклеточной петли может определять селективность парацеллюлярной поры, так как несет сайт связывания ионов и составляет выстилку поры [51]. На данный момент предложено 2 модели регулируемого парацеллюлярного транспорта через плотные контакты клаудина: динамическое разрушение и восстановление тяжей контактов или динамическое разрушение и восстановление транс-взаимодействий между клаудинами соседних клеток (рис. 3) [53]. Кроме клаудинов трансмембранные белки плотных контактов представлены белками семейства MARVEL<sup>7</sup> – окклюдином, трицеллюлином и MarvelD3, а также иммуноглобулиноподобными белками JAM<sup>8</sup>. Белки JAM могут участвовать в формировании поры в рамках плотного контакта, обеспечивающей селекцию веществ по размеру [53]. Окклюдин участвует в динамической регуляции плотных контактов так как степень его фосфорилирования важна для сборки стабилизация и регуляция плотных контактов, их контакта [54]. Сборка, взаимодействие с актиновым цитоскелетом опосредуются адаптерными белками

 $<sup>^{6}</sup>$  PDZ – характерный мотив сигнальных белков, название представляет собой акроним от первых белков, где был найден этот мотив (Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), and Zonula occludens-1

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> MARVEL – от англ. MAL (myelin and lymphocyte protein) and related proteins for vesicle trafficking and membrane link – (миелин и белок лимфоцитов) и родственные белки для переноса везикул и связи с мембраной

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> JAM – от англ. junctional adhesion molecules – соединительная молекула адгезии

ZO<sup>9</sup>(1-3), которые также принимают участие в процессах сигнализации и образуют каркас для взаимодействия с цингулином, факторами обмена гуаниновых нуклеотидов, активирующими ГТФазы белками, белками с множественными PDZдоменами (MUPP-1<sup>10</sup>, MPDZ<sup>11</sup>) [55], симплекином [56] и некоторыми другими.



**Рис. 3.** Плотные контакты. А – схема строения и организации на мембране; Б – регуляция парацеллюлярного транспорта через плотные контакты на основе клаудинов (селекция по заряду) и на основе JAM (селекция по размеру); В – возможные механизмы регуляции плотными контактами парацеллюлярного транспорта путем разрыва тяжа контактов или временного размыкания самих контактов. Адаптировано по [53]

#### 1.1.4. Десмосомы

Десмосомы представляют собой межклеточные контакты, интегральные белки которых соединены с промежуточными филаментами клетки. Они обеспечивают прочное механическое связывание клеток и стабилизируют архитектуру ткани. Интегральные белки десмосом представлены десмоглеинами (1-4) и десмоколлинами (1-3), они принадлежат к семейству кадгеринов и их транс-

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> ZO – от англ. zonula occludens – адаптерный белок

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> MUPP – от англ. multi-PDZ domain protein-1 – белок с множественными PDZ-доменами-1 (содержит 13 мотивов) <sup>11</sup> MPDZ – от англ. multiple PDZ domain protein – белок с множественными доменами PDZ

взаимодействие происходит ПО принципу, характерному ДЛЯ классических кадгеринов (рис. 2), однако при созревании десмосомы они переходят в гиперадгезивное состояние, в котором соединение уже не зависит от наличия Ca<sup>2+</sup> [37]. Цитоплазматический С-конец десмоглеинов значительно длиннее, чем у десмоколлинов и содержит уникальные последовательности, которые могут принимать участие в формировании более стабильного соединения клеток за счет ингибирования интернализации десмоглеинов [57]. Десмосомные кадгерины взаимодействуют с промежуточными филаментами цитоскелета опосредованно через систему адаптерных белков – плакофилинов, плакоглобина и десмоплакина (рис. 4). Показано также их взаимодействие с β-катенином [58].



**Рис. 4.** Схема строения десмосом. Интегральные белки представлены десмосомными кадгеринами. Контакт основан на взаимодействии с промежуточными филаментами через адаптерные белки. Адаптировано по [59]

Плакоглобин, плакофилины, и катенины относятся к семейству белков с характерными повторами Armadillo. Плакофилины входят в подсемейство p120катенинов и содержат 9 повторов, а плакоглобин и β-катенин содержат 12 повторов. Десмоплакин относится к цитолинкерам семейства плакинов и выступает линкером между плакоглобином, плакофилинами и промежуточными филаментами, и, кроме того, участвует в кластеризации десмосомных кадгеринов. Стоит отметить, что помимо участия, собственно, в формировании контакта адаптерные белки десмосом выполняют и другие важные сигнальные функции, в частности плакофилин-2 может регулировать транскрипцию рибосомальной и транспортной РНК за счет связывания с РНК-полимеразой III, или, связываясь с β-катенином усиливать транскрипционную активность, опосредованную TCF, а десмоплакин находясь в ядре способен связываться с теломерами, участвуя в их защите от повреждений [59-61].

#### 1.1.5. Щелевые контакты

Щелевые контакты представляют собой каналы между клетками, которые формируются за счет взаимодействия двух полуканалов (коннексонов) на соседних клетках (рис. 5). Коннексоны могут существовать и автономно, осуществляя взаимодействие клетки с внеклеточной средой. Шелевые контакты также участвуют в поддержании полярности клеток. Их расположение на мембране может различаться в зависимости от ткани и быть апиколатеральным или базолатеральным [62,63]. Они представляют собой гомомерные или гетеромерные гексамеры, образованные из белков коннексинов. Семейство коннексинов по гомологии последовательностей можно разделить на 5 подсемейств  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$ , принадлежность к которым определяет способность индивидуальных коннексинов к гетерологичной олигомеризации [64,65].



**Рис. 5.** Строение щелевых контактов. А – формирование коннексонов различного типа; Б – белок коннексин и его основные адаптерные белки. Адаптировано по [66]

Коннексины обладают 4 трансмембранными доменами, двумя внеклеточными и одной внутриклеточной петлей, а также внутриклеточными N- и C-концевыми хвостами. Наиболее консервативными областями молекулы коннексина являются внеклеточные петли, они включают по три характерных остатка цистеина и отвечают за стыковку коннексонов соседних клеток между собой [67], а также могут выступать в качестве внеклеточных редокс-сенсоров [68]. Трансмембранные домены коннексина и N-концевая последовательность также являются относительно областями. Трансмембранные формируют консервативными домены И поддерживают каркас коннексона и трансмембранную пору. Показано, что N-конец коннексинов участвует В доставке коннексина к мембране, опосредует совместимость во время гетерологичной олигомеризации и участвует в потенциалзависимом открытии каналов [69].

Через щелевые контакты могут проходить небольшие молекулы размером до 1,2 кДа, в частности, глюкоза, аминокислоты, нуклеотиды, АТФ, НАД<sup>+</sup>, ионы (Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, бикарбонат), вторичные мессенджеры (инозитол-3-фосфат, цАМФ), активные формы кислорода (АФК), пептиды и микроРНК [63]. Показано, что передача сигналов посредством щелевых контактов обусловлена не только их канальными функциями, но и сигнальной способностью молекулы коннексина, в частности ее Сконца. Эти сигнальные функции могут быть обусловлены как посттрансляционными модификациями С-конца (фосфорилированием, ацетилированием, убиквитинилированием), так и взаимодействиями с адаптерными и сигнальными белками (ZO-1, Src, β-катенином, дребрином, Bax<sup>12</sup> и др.) [70].

#### 1.1.6. Контакты клетка-внеклеточный матрикс

Контакт клетки с внеклеточным матриксом (ВКМ) осуществляется за счет фокальных контактов и полудесмосом. Оба этих типа контактов в качестве интегральных белков содержат гетеродимеры α- и β-интегринов, но фокальные контакты связаны с актиновыми волокнами цитоскелета, а полудесмосомы – с промежуточными филаментами (рис. 6).

Состав фокальных контактов различается в зависимости от того, какие стимулы на них приходят из внеклеточной среды (состав ВКМ, механическое

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup> Вах – от англ. Bcl2 associated X protein – X белок, ассоциированный с Bcl2. Белок, который образует димер с Bcl2 и участвует в запуске апоптоза

воздействие) и внутриклеточной среды. Состав димера интегрина отвечает за специфичность к субстрату [71]. Множество адапторных белков фокальных контактов организовано в 3 слоя: (i) интегриновый сигнальный слой, (ii) актинрегуляторный слой и (iii) слой находящийся между ними, отвечающий за передачу механического воздействия [72]. Наиболее изученные адаптерные белки в (i) слое – паксилин и FAK<sup>13</sup> во (ii) слое – зиксин и VASP<sup>14</sup>; и в (iii) слое – талин и винкулин [73].



**Рис. 6.** Схема строения контактов клетка-матрикс. А – фокальные контакты; Б – полудесмосомы. Адаптировано по [72,74]

При контакте интегринового димера с ВКМ запускается сборка фокального контакта. Димер интегрина претерпевает конформационные перестройки и начинает кластеризоваться при взаимодействии с адаптерными белками паксиллином, талином и винкулином [75]. Паксилин один из первых белков, рекрутирующихся в формирующийся контакт, и он несет на себе наибольшее число сайтов связывания с другими адаптерными белками, в том числе FAK [76]. FAK – нерецепторная тирозинкиназа, обладающая механочувствительностью, которая является одним из ключевых сигнальных белков благодаря как своей собственной киназной активности, так и способности выступать каркасом для других сигнальных и

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup> FAK – от англ. focal adhesion kinase – киназа фокальной адгезии

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup> VASP – от англ. vasodilator-stimulated phosphoprotein – стимулируемый вазодилататорами фосфопротеин

каркасных белков в том числе и талина [77]. Талин – адапторный белок, который способен прямо связываться с белками всех уровней фокального контакта ( $\beta$ -интегринами, FAK и паксилином, винкулином, актином и  $\alpha$ -актинином) [78]. Винкулин напрямую связывается с актиновыми филаментами, белками актинрегуляторного слоя ( $\alpha$ -актинином, зиксином, VASP) и паксилином, причем это связывание регулируется механозависимым фосфорилированием паксилина, что в итоге позволяет винкулину стимулировать полимеризацию актина в месте механического стимула [75]. Зиксин и VASP являются партнерами по связыванию, которые вместе рекрутируются в актин-регуляторный слой фокального контакта и несут сайты связывания GEF<sup>15</sup> для малой ГТФазы Rho<sup>16</sup>, через которую зиксин, VASP и винкулин взаимозависимым образом стимулируют полимеризацию актина в ответ на механические раздражители [79].

Актиновые волокна, ассоциированные с фокальными контактами, могут располагаться вентрально, то есть параллельно мембране, соприкасающейся с субстратом, и дорсально – под углом мембране, по направлению к ядру [80]. Они представляют собой комплекс из 10–30 филаментов F-актина, сшитых α-актинином, и связанных с сократительными филаментами миозина II. Сила, воздействующая на фокальные контакты, зависит от комбинации сократительной способности миозина-II, которая определяет степень сокращения актиновых волокон, и жесткости ВКМ. Фокальные контакты – высокодинамические структуры, и, выступая точками прикрепления и одновременно регуляторами поведения актинового цитоскелета, они позволяют клетке двигаться по волокнам ВКМ [81].

Полудесмосомы, в отличие от фокальных контактов, опосредуют прочное прикрепление клетки к ВКМ, устанавливая связь между базальной мембраной (БМ) и сетью кератиновых промежуточных филаментов, устойчивых к механическим нагрузкам, таким образом обеспечивая целостность эпителия [74]. Для

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup> GEF – от англ. guanine exchange factor – фактор гуанинового обмена

<sup>&</sup>lt;sup>16</sup> Rho – от англ. Ras homolog family member – малая ГТФаза

стратифицированного эпителия характерны полудесмосомы I типа: они состоят из интегрина α6β4, изоформы плектина 1а, тетраспанина CD151 и двух изоформ BPAG <sup>17</sup> – BP230 и BP180 [82]. Полудесмосомы типа II характерны для простого эпителия и состоят только из интегрина α6β4 и плектина [83]. Разборка полудесмосом важна для терминальной дифференцировки кератиноцитов и в процессе регенерации эпителия, кроме того, она происходит при инвазии злокачественных опухолей кожи [74].

# 1.2. Роль клеточных контактов в регуляции пролиферации и миграции клеток 1.2.1. Роль белков клеточных контактов в регуляции пролиферации

Белки. составляющие межклеточные контакты, принимают участие В регуляции жизненно важных процессов в клетке за счет непосредственного участия в путях внутриклеточной сигнализации или опосредованного воздействия на эти пути. В случае адгезивных контактов их основной вклад в регуляцию пролиферации и дифференцировки состоит в поддержании баланса между секвестрацией и высвобождением β-катенина, участвующего в передаче сигнала по пути Wnt. В норме при наличии интактных кадгеринов *β*-катенин находится в связанном состоянии, а потеря кадгерина ведет к его высвобождению и реализации его функций как транскрипционного фактора [84]. Мутации в различных компонентах пути Wnt, предотвращающие деградацию β-катенина, например, мутации самого βкатенина, предотвращающие его фосфорилирование CKI/GSK-3<sup>18</sup> [85] или мутации в гене APC<sup>19</sup> (участник комплекса деградации) [86], напрямую связаны с неконтролируемой пролиферацией клеток, ведущей к развитию опухоли. Кроме того, АРС может регулировать пролиферацию независимо от β-катенина, выступая как каркасный белок для участников сигнального пути Hippo<sup>20</sup> и воздействия на

<sup>&</sup>lt;sup>17</sup> BPAG – от англ. bullous pemphigoid antigen 1 – антиген буллезного пемфигоида 1

<sup>&</sup>lt;sup>18</sup> CKI/GSK-3 – от англ. cyclin-dependent kinase inhibitor / glycogen synthase kinase 3 – ингибтор циклин-зависимой киназы / киназа гликоген-синтазы 3

<sup>&</sup>lt;sup>19</sup> АРС – от англ. adenomatous polyposis coli – супрессор опухолей

<sup>&</sup>lt;sup>20</sup> Нірро – сигнальный путь, центральным звеном которого является киназа Нірро «гиппопотам» (от англ. hippopotamus). Данный путь контролирует размер органов посредством регуляции пролиферации и апоптоза

транскрипционный фактор YAP<sup>21</sup> [87]. Регуляция пролиферации адгезивными контактами по пути Нірро может осуществляться напрямую за счет взаимодействия с YAP при связывании с ним Е-кадгерина и α-катенина, или за счет повышения активности LATS<sup>22</sup> киназы, которая подавляет активацию YAP [88].

Белки плотных контактов также участвуют в контроле клеточного цикла, однако роли отдельных белков здесь противоречивы. Показано, что экспрессия клаудина-5, -7 или -18 ингибирует переход клеточного цикла в S-фазу за счет подавления фосфорилирования Akt [89], а в случае клаудина-18 еще и за счет секвестрации YAP и недопущения его транслокации в ядро [90]. В то же время есть целый ряд свидетельств, что клаудины могут усиливать пролиферацию [91,92].

Участие окклюдина в регуляции клеточного цикла, а именно в подавлении пролиферации, может быть опосредовано секвестрацией участников ПУТИ сигнализации Нірро (YAP и TEAD<sup>23</sup>) [93]. Адаптерные белки ZO секвестируют транскрипционный фактор ZONAB<sup>24</sup>, циклин D1 и циклин-зависимую киназу 4, тем самым также ограничивая пролиферацию [94,95]. К активации пролиферации может привести высвобождение из комплекса адаптерных белков плотных контактов, в частности цингулина и парацингулина. Выход из состава плотного контакта приводит ИХ конформационному изменению, которое позволяет К ИМ взаимодействовать с микротрубочками, ZO-1 и p114RhoGEF, способствуя активации киназы RhoA, что в свою очередь запускает переход G1/S [96]. Интегральный белок JAM-А подавляет активацию Akt, и показано, что его потеря активирует Akt, которая фосфорилирует β-катенин, что стимулирует его перемещение в ядро и связывание с транскрипционным фактором TCF/LEF [97].

<sup>&</sup>lt;sup>21</sup> YAP – от англ. Yes associated protein (Yes – киназа из семейства Src)

 $<sup>^{22}</sup>$  LATS – от англ. Large tumor suppressor – большая супрессорная киназа опухолей

 <sup>&</sup>lt;sup>23</sup> TEAD – от англ. transcriptional enhanced associate domain – транскрипционный усиленный вспомогательный домен
<sup>24</sup> ZONAB – от англ. ZO-1-associated nucleic acid binding protein – связывающий нуклеиновые кислоты белок,

ассоциированный с ZO-1

Участие компонентов десмосом в регуляции пролиферации может быть опосредовано их взаимодействием с рецепторами факторов роста семейства EGFR <sup>25</sup>. Так, комплекс десмоглеина-1 и десмоплакина, взаимодействуя с компонентом сигналосомы конститутивного фотоморфогенеза 9, опосредуют удаление EGFR с поверхности клеточной мембраны за счет снижения уровня его фосфорилирования. Это приводит к ослаблению сигнализации от данного рецептора и снижению пролиферативной активности [98]. Экспрессия десмоглина-2, напротив, положительно регулирует пролиферацию клеток за счет активации передачи сигналов EGFR [99]. В плюрипотентных стволовых клетках он необходим для самообновления и подавления дифференцировки [100]. Десмоглеин-3 может способствовать пролиферации за счет повышения экспрессии и активации EGFR [101] и за счет поддержания клеточного цикла путем удержания плакоглобина на мембране, образом плакоглобином таким препятствуя подавлению транскрипционного фактора ТСГ [102]. Однако при этом десмоглеин-3 может контролировать пролиферацию и по пути Нірро за счет секвестрации УАР [103]. Данные относительно десмоколлинов преимущественно свидетельствуют об их антипролиферативной действие роли, однако В случае рака яичника фолликулостимулирующего гормона приводило К повышению экспрессии десмоколлина-3 и EGFR, которые положительно регулируют друг друга. Кроме того, именно повышение экспрессии десмоколлина-3 приводило к повышению уровня фосфорилированной формы Akt, что приводило к усилению пролиферации за счет активации пути PI3K/Akt<sup>26</sup> [104]. Плакоглобин может ингибировать пролиферацию путем регулировки передачи сигналов от EGFR путем подавления активации р38МАРК<sup>27</sup> [105]. Десмоплакин может подавлять пролиферацию за счет контроля

<sup>&</sup>lt;sup>25</sup> EGFR – от англ. epidermal growth factor receptor – рецептор эпидермального фактора роста

<sup>&</sup>lt;sup>26</sup> PI3K/Akt – сигнальный путь, включающий фосфоинозитид-3-киназу (PI3k) и протеинкиназу В альфа Akt (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, protein kinase В alpha). Путь отвечает за выживание, пролиферацию и контроль клеточного цикла

<sup>&</sup>lt;sup>27</sup> p38MAPK – от англ. p38 mitogen-activated protein kinase – p38 митоген-активируемая протеинкиназа

активации Erk1/2<sup>28</sup> и Akt [106]. Данные относительно влияния плакофилинов на процесс пролиферации противоречивы, однако для плакофилина 2 и 3 показано, что они могут усиливать пролиферацию за счет усиления активации EGFR [107,108].

Участие щелевых контактов в пролиферации клеток, особенно в опухолях, сильно зависит от контекста, и может быть как про- так и антипролиферативным. Кроме того, оно может быть опосредовано как их канальными функциями, так и сигнальной способностью основных белков данного типа контактов, коннексинов. Щелевые контакты долгое время считались супрессорами опухолей, так как их потеря часто ассоциируется с усилением пролиферации. Подавление пролиферации за счет канальных функций щелевых контактов может быть обусловлено транспортом цАМФ [109], миРНК [110], за счет неканальных функций оно может быть обусловлено секвестрацией β-катенина и прерыванием передачи сигнала по пути Wnt [63] или за счет ингибирования активности Src [111]. Активация пролиферации может быть вызвана также транспортом миРНК [112] или АТФ [113] через щелевые контакты.

Участие контактов клетка-матрикс в регуляции пролиферации основано на передаче сигналов от интегрина, в частности, приводящих к индукции циклина D1 и подавлению ингибиторов циклин-зависимых киназ. Появляется все больше свидетельств того, что сила внешнего механического воздействия может служить фактором, влияющим на прохождение клеткой контрольных точек клеточного цикла. Так, сигнальный модуль FAK/Rac<sup>29</sup> передает механозависимые сигналы в контрольную точку G1/S [114], при воздействии сил сжатия на клетку FAK участвует в переориентации митотического веретена [115], а при воздействии сил растяжения киназа ATR<sup>30</sup> перемещается в ядерную оболочку, где она предотвращает ошибки репликации [116]. Кроме этого, повышенная жесткость BKM влияет на ход клеточного цикла за счет активации пути Нірро [117].

<sup>&</sup>lt;sup>28</sup> Erk – от англ. extracellular signal-regulated kinase – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами

 $<sup>^{29}</sup>$  Rac – от англ. Ras-related C3 botulinum toxin substrate – малая сигнальная ГТФаза из семейства Rho

<sup>&</sup>lt;sup>30</sup> ATR – от англ. ataxia, telangiectasia and Rad3-related protein – белок относящийся к атаксии

#### 1.2.2. Роль белков клеточных контактов в регуляции миграции

В многоклеточном организме миграция клеток, как индивидуальная, так и коллективная, необходима в процессе эмбриогенеза, во время обновления тканей, процессов регенерации. Движение клеток может быть амебоидным, то есть минимально зависеть от их прикрепления к субстрату и не требовать деградации ВКМ, и мезенхимальным, когда субстрат выступает в качестве опоры, по которой клетка движется. Для осуществления этих двух типов миграции задействуются принципиально разные механизмы: в случае амебоидного движения основной движущей силой является сокращение актомиозина, которое позволяет сдавить тело клетки при прохождении между волокнами ВКМ [118]. Мезенхимальное движение предполагает ремоделирование ВКМ и требует четко регулируемой сборки и разборки клеткой контактов с ее микроокружением: прикрепление передней части клетки и образование ламеллоподий и филоподий за счет полимеризации актина, с одновременной разборкой контактов на задней части клетки обусловливает смещение центра ее массы, за счет чего и осуществляется движение [42].

Движение по ВКМ регулируется фокальными контактами. Формирующийся фокальный контакт испытывает большую силу растяжения за счет связки талинвинкулин-актин, где винкулин, двигаясь из проксимального участка фокального контакта к дистальному, связывает актин и замедляет его ретроградное движение [75]. По мере увеличения силы, действующей на растущий фокальный контакт, происходит усиление передачи сигналов от интегрина к малой ГТФазе Rap1<sup>31</sup>, активирующей талин, что позволяет привлечь новые молекулы интегрина [119]. Винкулин за счет фосфорилирования Src киназой переходит в открытое состояние, что приводит к усилению адгезии и, соответственно, увеличению силы, воздействующей на контакт [120]. Разборка фокальных контактов, достигших своего критического размера, осуществляется путем конкуренции белка Kank2 с актином за связывание с талином, что приводит к уменьшению силы, действующей на контакт,

<sup>&</sup>lt;sup>31</sup> Rap1 – от англ. Ras-proximate-1 – малая ГТФаза

и появлению возможности взаимодействия интегринов с адаптерными белками обеспечивающими их клатрин-опосредованный эндоцитоз [121].

Для адгезивных межклеточных контактов также широко показано участие в регуляции миграции клеток, с одной стороны как непосредственного участника формирования локомоторного аппарата, для движения клеток по клеточному слою, так и в качестве как организующего компонента ответственного за связь и координацию клеток участвующих в коллективной миграции по ВКМ.

Механизм, по которому адгезивные контакты регулируют миграцию по клеточному слою, аналогичен таковому для фокальных контактов, и сопровождается контролируемой сборкой и разборкой актина. Клеточный слой организован таким образом, что в нем есть контакты между индивидуальными клетками (двуклеточный контакт) и контакт, соединяющий три клетки (триклеточный контакт). Постепенное разрушение двуклеточного контакта соседних клеток позволяет клеткам, перпендикулярно расположенным к сохранившемуся триклеточному контакту, вклиниться в место ослабления адгезии и сформировать новый двуклеточный контакт, тем самым физически разъединяя ранее контактировавшие клетки [122]. Это может обеспечиваться сократительной способностью актомиозина за счет работы RhoA и форминов [43].

Участие адгезивных контактов в качестве регуляторов и координаторов коллективной миграции клеток по ВКМ состоит с одной стороны в том, что именно они скрепляют клетки участвующие в движении, пока фокальные контакты выполняют тянущую функцию [43]; а с другой, в том, что они «поставляют» активированный актин для формирующихся за счет работы фокальных контактов ламеллоподий, при участии комплекса Е-кадгерина с Arp2/3<sup>32</sup> как в лидерных, так и в ведомых клетках. Кроме того, компонент адгезивных контактов α-катенин

<sup>&</sup>lt;sup>32</sup> Arp2/3 – от англ. actin related protein 2/3 – комплекс из 7 белков являющийся центральным регулятором актинового цитоскелета

определяет четкое направление миграции клеток и, в итоге, ее общую успешность [123].

Участие белков плотных контактов В регуляции миграции может осуществляться как за счет адаптерных, так и интегральных белков. Активация миграции может происходить за счет фосфорилирования ZO-1 киназой РКСе<sup>33</sup>, что способствует его выходу из состава плотных контактов и перемещению в формирующиеся ламеллоподии на лидерном конце клетки, где он взаимодействует с  $\alpha$ 5-интегрином, активируя миграцию [124]. Сигнализация, опосредованная клаудином-11 и ЈАМ-А, может способствовать миграции за счет поддержания нахождения интегрина-β1 на мембране клетки за счет активации работы ГТФазы Rap1 [125]. Клаудины могут активировать миграцию путем опосредованного участия во внутриклеточной сигнализации: они способны активировать транскрипционные факторы, ответственные за выработку матриксных металлопротеиназ [126,127]. В тоже время белки плотных контактов могут и подавлять миграцию. Адаптерный белок плотных контактов, цингулин, способен подавлять миграцию за счет связывания с активаторами ГТФазы RhoA, что приводит ингибированию ее активности [128].

Десмосомы являются маркерами эпителиальной дифференцировки и их участие в миграции обусловлено их уходом с клеточной поверхности. Показано, что потеря белков десмосом необходима для ЭМП в процессе морфогенеза и при миграции опухолевых клеток. Стоит, однако, отметить, что в процессе коллективной миграции, в частности при регенерации эпителия или при распространении опухоли, мигрирующей группы сохраняют объединяющие клетки В составе ИХ функциональные десмосомы [129]. Недавно было продемонстрировано что оборот компонентов даже зрелых высокоадгезивных десмосом в клетке происходит неравномерно, в частности оборот плакофилина очень быстрый и наблюдается постоянный динамический обмен между десмосомным и цитоплазматическим

<sup>&</sup>lt;sup>33</sup> РКС $\varepsilon$  – от англ. protein kinase С $\varepsilon$  – протеинкиназа С  $\varepsilon$ 

пулами этого белка, а подвижность десмосомных кадгеринов сильно ограничена. Показано, что даже интернализация десмосом происходит без их диссоциации, то есть одна из клеток интернализует десмосому, полностью сохраняя все ее компоненты, в том числе и обрывки промежуточных филаментов. Это свидетельствует о том, что для интернализации десмосом необходимо приложение механического воздействия, опосредованного работой актомиозиновой сети [130].

Участие щелевых контактов в миграции клеток в основном состоит в координации этого процесса в лидерных клетках как за счет канальных функций контактов, например аутокринной пуринэргической сигнализации [131], так и участия коннексинов во внутриклеточной сигнализации, в частности за счет взаимодействия С-хвоста коннексина с Rac1<sup>34</sup> и контрактином [132].

#### 1.3. Роль белков контактов в развитии опухолей

# 1.3.1. Участие белков адгезивных контактов в определении фенотипа опухолевых клеток и формировании контактов с клетками стромы

Микроокружение опухоли (МО) представляет собой динамическую структуру, которая включает в себя опухолевые клетки, клетки стромы (фибробласты, иммунные клетки), кровеносные сосуды, внеклеточный матрикс, и характеризуется специфическими физико-химическими условиями (гипоксия, ацидоз, высокое интерстициальное давление жидкости). Совокупность этих компонентов, а также реципрокных отношений между ними позволяет опухоли развить адаптивные механизмы для преодоления неблагоприятных условий: способствует ангиогенезу для восстановления снабжения опухоли кислородом и обеспечения ее дренажа, миграции опухолевых клеток и их диссеминации и защите опухоли от иммунного надзора [3]. Молекулы клеточной адгезии участвуют во внутриклеточной сигнализации, регулирующей эти процессы.

 $<sup>^{34}</sup>$  Rac – ГТФаза из семейства Rho

В опухолях эпителиального происхождения присутствие контактов на основе Е-кадгерина в большинстве случаев свидетельствует об их менее агрессивном фенотипе, а его потеря обычно сопровождается ЭМП, инвазивностью опухоли и метастазированием. Тем не менее, *de novo* экспрессия Е-кадгерина в опухолях, происходящих из тканей, для которых его экспрессия не характерна, также свидетельствует о дедифференциации клеток и усилении злокачественного фенотипа [133]. Механизмы, по которым Е-кадгерин выполняет роль супрессора опухолей, могут заключаться (i) в секвестировании β-катенина и контроле сигнализации по пути Wnt [27]; (ii) в ингибировании циклин-зависимых киназ путем усиления экспрессии их ингибиторов [134]; (iii) регуляции внешнего пути апоптоза за счет стабилизации комплекса рецепторов смерти DR4/DR5<sup>35</sup>, и стабильной сборке комплексов DISC<sup>36</sup> что позволяет им реагировать даже на сниженные концентрации лиганда смерти TRAIL<sup>37</sup> [135]. Про-туморигенная роль Е-кадгерина характерна для опухолевых клеток в метастатических узлах, так как она способствует успешной адаптации клеток в новом микроокружении. Показано, что установление контактов на основе Е-кадгерина между клетками опухоли молочной железы и гепатоцитами приводило к активации сигнализации по пути Erk/MAPK и протеинкиназы B, ответственных за выживание [136].

Для опухолевых клеток часто характерно переключение с синтеза Е-кадгерина на синтез N-кадгерина, что считается отличительной чертой ЭМП. Механизмы, по которым N-кадгерин способствует развитию подвижности опухолевых клеток, состоят в его участии в сигнализации, которая в конечном итоге приводит к выработке матриксных металлопротеиназ (ММП) и разрушении ВКМ. Высокая экспрессия N-кадгерина активировала сигнализацию от рецептора фактора роста фибробластов (FGFR<sup>38</sup>) за счет его стабилизации на мембране, это в свою очередь

<sup>&</sup>lt;sup>35</sup> DR4/DR5 – от англ. Death Receptor 4 и 5 – рецепторы семейства рецептора фактора некроза опухолей

<sup>&</sup>lt;sup>36</sup> DISC – от англ. death induced silencing complex – индуцирующий смерть клетки сигнальный комплекс

<sup>&</sup>lt;sup>37</sup> TRAIL – от англ. tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand – лиганд, зависимый от фактора некроза опухолей, индуцирующий апоптоз

<sup>&</sup>lt;sup>38</sup> FGFR – от англ. fibroblast growth factor receptor – рецептор фактора роста фибробластов
вызывало усиление фосфорилирования Erk киназы, что активировало экспрессию ММП9 [137]. Активация синтеза ММП9, опосредованная N-кадгерином, может идти также по пути Wnt, так как цитоплазматический домен N-кадгерина способен усиливать активность как  $\beta$ -катенина как транскрипционного фактора [138]. Кроме того, N-кадгерин может также принимать участие в активации ангиогенеза в опухоли за счет усиления экспрессии VE-кадгерина [139], за счет обеспечения благоприятных условий для ремоделирования сосудистой сети при участии сигнализации от рецептора FGFR [140], а также за счет активации экспрессии цитокина MCP-1<sup>39</sup> и стимуляции развития сосудистой сети [141]. Необходимо отметить, что в ряде работ, напротив, показана возможность уменьшения злокачественности фенотипа опухолевых клеток при индукции экспрессии N-кадгерина. В частности, контакты на его основе были необходимы для сдерживания инвазии глиомы за счет уменьшения подвижности клеток [142,143].

Гетеротипические взаимодействия между различными кадгеринами также могут участвовать в прогрессии опухоли. Установление контакта между Nкадгерином опухоль-ассоциированных фибробластов и Е-кадгерином опухолевых способствует коллективной миграции опухолевых клеток клеток. Сила, прикладываемая на такой контакт за счет движения фибробласта, вызывает привлечение в него β-катенина, усиливая связь между клетками. Кроме того, Nкадгерин и привлекаемые в контакт нектин и афадин обусловливают реполяризацию фибробласта по направлению от опухолевой клетки, что еще увеличивает тянущую силу, и, соответственно, эффективность миграции [144]. Накапливаются данные о том, что участие гетеротипических взаимодействий между кадгеринами, в частности между N- и VE-кадгерином могут способствовать эктравазации метастатических опухолевых клеток [145,146].

Интересно, что в условиях МО и для Е-кадгерина и для N-кадгерина характерно образование их растворимой формы, образующейся за счет

<sup>&</sup>lt;sup>39</sup> MCP1 – от англ. monocyte chemoattractant protein-1 – белок-хемоаттрактант моноцитов

протеолитического отщепления внеклеточного домена, что в случае обоих белков является плохим прогностическим маркером. Присутствие растворимой формы Екадгерина нарушает формирование адгезивных контактов, что приводит к усилению пролиферации и миграции клеток, в том числе за счет аутокринной и паракринной сигнализации, повышающей активность дезинтегрина и наработку ММП [147]. Кроме того, возможно экспонирование Е-кадгерина на поверхности экзосом, что представляет собой один из вариантов растворимой формы этого белка. Гетерологичная димеризация такого Е-кадгерина с VE-кадгерином на поверхности эндотелиоцитов активирует ангиогенез за счет активации β-катенина и запуска сигнализации по пути NF-кВ<sup>40</sup> [148]. Для растворимой формы N-кадгерина также было показано его участие в активации ангиогенеза и запуске миграции эндотелиоцитов, осуществляемых за счет связывания с FGFR [140].

Недавно было показано переключение с синтеза Е-кадгерина на синтез Ркадгерина в опухолях молочной железы, причем и для Р-, и для Е-кадгерина отмечалась их цитоплазматическая локализация [149,150].

## 1.3.2. Участие белков плотных контактов в формировании фенотипа опухолевых клеток

В опухолевых тканях часто наблюдается нарушение нормального распределения белков плотных контактов. Клаудины – одна ИЗ самых противоречивых групп белков контактов в контексте определения фенотипа опухолевых клеток. Для поддержания нормального фенотипа ткани важен тонкий баланс в соотношении этих белков и для каждого типа ткани оптимальные уровни представленности клаудинов свои [151]. Онкосупрессорные функции клаудинов могут реализовываться из-за их способности удерживать многие ключевые элементы сигнальных путей в субмембранном компартменте, чтобы ингибировать их активацию напрямую или косвенно через взаимодействия с другими каркасными

<sup>&</sup>lt;sup>40</sup> NF-кВ – от англ. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated В cells – ядерный фактор «каппа-би»

белками, в частности YAP/TAZ<sup>41</sup>, β-катенином и киназой 1 пируватдегидрогеназы (PDK1<sup>42</sup>) [152,153].

Сверхэкспрессия различных клаудинов может активировать пролиферацию, миграцию опухолевых клеток и их устойчивость к аноикису по пути зависимому от EGFR, что [154] или из-за усиления экспрессии Bcl-2<sup>43</sup> [155]. Кроме того она может ингибировать дифференцировку клеток за счет передачи сигнала по пути Notch [156] и усиливать инвазию за счет увеличения экспрессии ММП9 [127] или активации передачи сигнала по пути с-Abl-PKC<sup>44</sup> [157].

Для белков плотных контактов также была показана способность влиять на путь передачи сигнала Erk/MAPK. Показано, что клаудин-7 может ингибировать пролиферацию и инвазию клеток колоректального рака путем регуляции передачи сигналов Erk и Src [158] и ингибирует миграцию и инвазию клеток рака легкого [159], однако он также способствует пролиферации плоскоклеточной карциномы пищевода [160]. Клаудин-1 участвует в индукции ЭМП по пути c-Abl-Ras-Raf-1/Erk1/2 в клетках печени [161]. Клаудин-2 активирует сигнальный путь EGFR/MEK<sup>45</sup>/ERK в клетках рака легкого [162]. В целом для клаудинов показано, что уровни их экспрессии и изменения этих уровней, сопровождающие патологические процессы имеют высокую тканеспецифичность.

Для клаудинов было также продемонстрировано, что их неправильная внутриклеточная локализация ассоциирована с более высокой агрессивностью опухоли. Неправильная локализация клаудина-1, а именно его перемещение в ядро, усиливает метастатический потенциал опухоли за счет подавления экспрессии Е-кадгерина и последующего перемещения β-катенина в ядро, что способствует сигнализации по пути Wnt [163]. Фактором неправильной локализации клаудинов

<sup>&</sup>lt;sup>41</sup> TAZ – от англ. transcriptional co-activator with PDZ-binding motif – транскрипционный ко-активатор, несущий мотив, связывающий PDZ

<sup>&</sup>lt;sup>42</sup> PDK1 – от англ. pyruvate dehydrogenase kinase 1 – киназа 1 пируватдегидрогеназы

<sup>&</sup>lt;sup>43</sup> Bcl-2 – от англ. B-cell lymphoma 2 – белковый фактор, подавляющий апаптоз

<sup>&</sup>lt;sup>44</sup> c-Abl – от англ. Abelson murine leukemia virus – цитоплазматическая и ядерная тирозинкиназа, протоонкоген

<sup>&</sup>lt;sup>45</sup> MEK – от англ. mitogen-activated protein kinase kinase – киназа митоген-активируемой протеинкиназы

может быть степень их фосфорилирования протеинкиназами А и С, что показано для клаудинов -3 и -4 [164,165].

Усиление злокачественного фенотипа было также продемонстрировано при потере белка плотных контактов окклюдина и сопровождалось потерей тканевой целостности и склонностью клеток к миграции. Данный эффект связан как с потерей адгезивной функции окклюдина, так и за счет его участия во внутриклеточной сигнализации [151]. Повышение представленности данного белка также может определять агрессивный фенотип опухоли за счет внутриклеточной сигнализации по пути PI3k/Akt [166].

#### 1.3.3. Участие белков десмосом в формировании фенотипа опухолевых клеток

Белки десмосом также могут проявлять как протуморигенные, так и онкосупрессорные свойства при различных типах рака в зависимости от контекста [167].

Для десмоколлинов в основном показано, что потеря их экспрессии является неблагоприятным прогностическим маркером. Например, потеря десмоколлина-2 способствует росту клеток колоректального рака за счет регуляции передачи сигналов по пути Akt/β-катенина [168]. Десмоколлин-3 может реализовать свои онкосупрессорные свойства за счет ингибирования сигнализации по пути MAPK/Erk за счет снижения уровня фосфорилированной формы Erk [169]. В то же время для десмоколлина-1 показано возрастание его экспрессии в метастазах рака молочной железы в лимфоузлы, причем это возрастание коррелировало со стадией опухоли [170].

В случае десмоглеинов присутствует такая же неоднозначность их роли в формировании фенотипа опухоли. Так, в ряде работ потеря десмоглеина-2 была ассоциирована с усилением злокачественности фенотипа клеток рака поджелудочной железы [171] и развитием устойчивости клеток рака мочевого пузыря к таргетной терапии [172]; потеря десмоглеина-1 была связана с низкой

выживаемостью пациентов с раком головы и шеи [173]. В то же время сверхэкспрессия десмоглеина-2 может способствовать пролиферации клеток немелкоклеточного рака легкого посредством регуляции CDKN1B<sup>46</sup> и CDK2<sup>47</sup> [174], и может выступать как однозначный неблагоприятный прогностический фактор при множественной миеломе [175]. Аналогично, сверхэкспрессия десмоглеина-3 способствует запуску миграции и инвазии опухолевых клеток, за счет регуляции активности эзрина при участии РКС и активности транскрипционного фактора AP-1 [176].

Адаптерные белки десмосом также принимают участии в регуляции жизненно важных процессов в клетке. Плакоглобин может снижать транскрипцию геновмишеней сигнального пути Wnt за счет связывания с соседними сайтами на Tcf-4 с β-катенином, таким образом, ингибируя связывание Tcf-4 с ДНК [177]. Таким образом, плакоглобин является негативным регулятором передачи сигналов Wnt/βкатенина и действует как супрессор опухолей/метастазов при различных формах рака. Например, при раке яичника экзогенная экспрессия плакоглобина более эффективна, чем экспрессия Е-кадгерина в подавлении роста и миграции клеток [178]. В то же время плакоглобин связан с дифференциальной активацией сигнальных путей PI3k/Akt и MAPK в опухоли поджелудочной железы [179].

Онкосупрессорные функции показаны и для плакофилинов, которые стабилизируют десмосомные кадгерины на мембране и десмоплакинов, которые опосредуют десмосомальных белков связь комплекса С промежуточными филаментами цитоскелета. Потеря плакофилинов 1–3 обнаруживается в некоторых [180]. экспрессии плакофилина 3 опухолях Снижение коррелирует С нестабильностью десмосом, повышенной миграцией клеток и плохим прогнозом для пациентов. Механизм подавления плакофилина-3 состоит в его транскрипционной репрессии фактором ZEB1<sup>48</sup>, который также является репрессором Е-кадгерина. Это

<sup>&</sup>lt;sup>46</sup> CDKN1B – от англ. cyclin-dependent kinase inhibitor 1B – ингибитор циклин-зависимой киназы 1B

<sup>&</sup>lt;sup>47</sup> CDK2 – от англ.cyclin-dependent kinase 2 – циклин-зависимая киназа 2

<sup>&</sup>lt;sup>48</sup> ZEB1 – от англ. zinc finger E-box-binding homeobox 1 – связывающий Е-бокс цинкового пальца гомеобокс 1

предполагает общую регуляцию адгезивных контактов и десмосом во время опухолевой прогрессии [181]. С другой стороны, плакофилин-1 может активировать трансляцию с-Мус<sup>49</sup>, что приводит к усилению пролиферации и выживанию клеток плоскоклеточной карциномы [182]. Потеря экспрессии десмоплакина способствует пролиферации клеток и опухолевой инвазии, связанной с повышенным уровнем фосфорилированных форм Erk1/2 и Akt [106], а его эктопическая экспрессия, напротив, приводила к снижению TCF/LEF-зависимой транскрипционной активности и снижению экспрессии генов-мишеней Wnt/ $\beta$ -катенина за счет усиления экспрессии плакоглобина [183].

#### 1.3.4. Участие щелевых контактов в формировании микроокружения опухоли

Участие шелевых контактов формировании MO проявляется В В интегрировании опухолевых клеток между собой и опухолевых клеток с клетками стромы. Щелевые контакты по сути являются прямыми каналами между клетками, что позволяет рассматривать объединенные ими клетки как функциональный синцитий [184]. Такая структура выступает платформой для метаболической кооперации и быстрой передачи сигналов в условиях МО. Например, щелевые быстро контакты позволяют регулировать размеры клеток В активно пролиферирующей опухоли. Клетки глубоких слоев опухоли испытывают большое напряжение, их размеры ограничены, поэтому транспорт воды к клеткам наружных слоев сопровождается транспортом ионов, который идет через щелевые контакты. Это вызывает набухание клеток наружных слоев, что приводит к усилению клеточной пролиферации [185]. Показано, что перенос глюкозы через контакты на основе коннексина-43 обусловливает уменьшение размера некротического ядра в сфероидах клеток опухоли толстой кишки и повышает уровень оксигенации и окислительного фосфорилирования глубоко залегающих клеток [186]. Для щелевых контактов также широко продемонстрирована локализация на концах туннельных

<sup>&</sup>lt;sup>49</sup> с-МҮС – от англ. cellular Myelocytomatosis – фактор транскрипции, протоонкоген

нанотрубок (тонких отростков опухолевых клеток длиной около нескольких клеточных диаметров), по которым может идти направленный транспорт молекул, в том числе и сигнальных, и даже органелл. Щелевые контакты, расположенные таким образом, обладают интегративными свойствами за счет способности объединять пространственно-разделенные клетки, что актуально для образования метастатических очагов. Кроме того, они участвуют в ангиогенезе за счет интеграции эндотелиоцитов и перицитов [187].

Щелевые контакты координируют метастатическую нишу В кости И опосредуют успешное формирование метастазов за счет взаимодействия опухолевых клеток с синцитием остеокластов. В микроокружении, создаваемом остеобластами, щелевые контакты опосредуют хемотаксис опухолевых клеток посредством своих функций. В лидирующих клетках С-хвост коннексина-43 неканальных взаимодействует с Rac1 и контрактином, тем самым поддерживая миграцию клеток в направлении остеогенной метастатической ниши [132]. Прямое взаимодействие опухолевых клеток с остеобластами через щелевые контакты обеспечивает приток Са<sup>2+</sup> к опухолевым клеткам, усиливая их злокачественный потенциал [188]. Взаимодействуя с синцитием остеокластов, опухолевые клетки способствуют резорбции кости, во время которой происходит массивное высвобождение кальция и трансформирующего фактора роста-бета (TGF $\beta^{50}$ ). TGF $\beta$  активирует коннексин-43, внутриклеточные концентрации кальция тем самым повышая И усиливая сигнализацию через щелевые контакты что запускает порочный круг, положительной обратной связи, усиливающей метастазирование в кость [189].

Успешное развитие опухолей в мозге может также обеспечиваться работой щелевых контактов, которые позволяют опухолевым клеткам использовать нормальные астроциты как союзников для усиления пролиферации и инвазии. В данном случае за счет сигнализации, опосредуемой С-хвостом молекулы коннексина, в нейральных клетках-предшественниках происходит ингибирование Src киназы, что

<sup>&</sup>lt;sup>50</sup> ТGF $\beta$  – от англ. transforming growth factor  $\beta$  – трансформирующий фактор роста  $\beta$ 

подавляет экспрессию β-катенина. Это запускает их дифференцировку в сторону астроцитов, нарушая баланс между пулом астроцитов и нейронов. В то время как установление щелевых контактов между нейроном и опухолевой клеткой может ослаблять пролиферацию из-за переноса в опухолевую клетку miR-124-3p [110], астроциты обладают про-онкогенной активностью за счет переноса в них miR-5096 из опухолевых клеток, что способствует инвазии [190]. Кроме того, щелевые контакты могут подготавливать метастатическую нишу в мозге, в частности, обеспечивая успешную экстравазацию опухолевых клеток за счет их взаимодействия с эндотелием. Далее опухолевые клетки устанавливают контакты с астроцитами, что позволяет им адаптироваться в новом микроокружении, после чего формируют контакты уже друг с другом, создавая таким образом метастатический узел [191]. взаимодействию Показано, предпочтительному опухолевых что клеток С астроцитами способствует с-МҮС [192].

Формирование щелевых контактов между опухолевыми клетками И фибробластами значительно виляет на формирование МО, причем установлено, что на ранней стадии опухоли это взаимодействие является онкосупрессорным, а на поздних – напротив, проонкогенным. Нормальные фибробласты кожи ингибируют образование колоний кератиноцитов путем сигнализации через каналы коннексина-43. Когда нормальные фибробласты подвергаются воздействию сублетальных доз перекиси водорода (например, при старении), они теряют экспрессию коннексина-43, что приводит к активации образования колоний кератиноцитами. Момент, когда в микроокружении начинают преобладать трансформированные тканевом фибробласты, [193]. Клетки является триггером малигнизации тканей плоскоклеточной карциномы паракринно подавляют формирование щелевых контактов между фибробластами (вероятно, посредством кальциевой сигнализации) [194]. Интересно, что в развитой плоскоклеточной карциноме, в областях, далеких от сосуда и обладающих богатой перлеканом стромой, (что характерно для инвазивной

опухоли), фибробласты, напротив, имели развитые щелевые контакты и находились в активированном состоянии [195].

По-видимому, в МО, пока щелевые контакты преимущественно используются нормальными клетками, которые «переучивают» опухолевые клетки (в частности, за счет транспорта миРНК), они действуют как супрессоры опухолей. Когда же нормальная коммуникация стромы утрачена, опухолевые клетки размножаются и начинают преобладать в микроокружении, таким образом щелевые контакты становятся инструментом, облегчающим прогрессию опухоли.

### 1.3.5. Участие контактов клетка-матрикс в формировании микроокружения опухоли

Участие клетка-матрикс быть контактов В развитии опухоли может опосредованно различными участниками комплекса белков, составляющих эти контакты. Интегрины в данном случае выступают первичными сенсорами ВКМ. В ходе прогрессии опухолей клетки претерпевают ЭМП, в ходе которого они теряют межклеточные контакты, отсоединяются от базальной мембраны и начинают экспрессировать  $\beta 1/\beta 3$ -интегрин. Такие клетки приобретают подвижность, которая фибронектином, итоге обеспечивает их регулируется ЧТО В повышенную способность к инвазии, в том числе за счет усиленной выработки ММП [196]. Связывание интегрина  $\beta_1$  с изоферментом М2 пируваткиназы вызывает усиление транскрипции ММП9 за счет активации пути FAK/Src/Erk, тем самым облегчая метастазирование [197]. Кроме того, прогрессия опухоли, опосредуемая интегринами, может обеспечиваться поддержанием пула стволовых опухолевых клеток. В частности, стволовой фенотип клеток опухоли молочной железы может поддерживаться за счет подавления транскрипции гена проапоптотического белка PUMA<sup>51</sup> при участии интегрина  $\alpha v\beta 3$  по пути сигнализации Src-SLUG<sup>52</sup> [198].

<sup>&</sup>lt;sup>51</sup> PUMA – от англ. p53 upregulated modulator of apoptosis – p53-активируемый модулятор апоптоза. Проапоптотический белок из семейства Bcl-2

<sup>&</sup>lt;sup>52</sup> SLUG – от англ. Zinc finger protein SNAI2 – транскрипционный фактор, вовлеченный в регуляцию ЭМП и подавление апоптоза

Экспрессия интегрина стромальными клетками также вносит значительный вклад в прогрессию опухоли. Димер интегрина α5β1 связывает димерный фибронектин, нарабатываемый растворимый опухоль-ассоциированными фибробластами, и способствует его полимеризации, которая, в свою очередь, выступает каркасом для сборки фибрилл коллагена I типа [199]. Организация секретированного фибронектина в анизотропную сеть запускается также за счет  $\alpha v\beta 3$ -интегрин, сократимости актомиозина, которая активирует который фибронектина, после обеспечивает этап сборки фибрилл начальный чего активируется α5β1-интегрин, собственно, организующий фибриллы. Готовые фибриллы располагаются перпендикулярно к поверхности опухоли что облегчает направленную миграцию опухолевых клеток [200]. Наличие выровненных фибрилл фибронектина характерно для точек инвазии опухоли поджелудочной железы [201]. Коллаген-связывающий интегрин α11β1, при взаимодействии с рецептором фактора роста тромбоцитов PDGFR $\beta^{53}$ ) активирует продукцию тенсцина C80 в опухольассоциированных фибробластах за счет активации пути JNK, что способствует инвазии рака молочной железы [202]. Показано также участие интегринов в создании иммуносупрессорного МО. Взаимодействие интегринов с белком SPARC<sup>54</sup>, характерным компонентом ВКМ в некоторых опухолях, индуцирует в опухолевых экспрессию гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего клетках фактора И интерлейкина-6, что привлекает иммуносупрессорные клетки миелоидного происхождения, участвующие в поддержании ЭМП и лекарственной устойчивости [203].

#### 1.3.6. Перекрестные взаимодействия разных типов контактов

Межклеточные контакты разного типа взаимно регулируют работу друг друга. Классическим примером такой регуляции является необходимость присутствия

<sup>&</sup>lt;sup>53</sup> PDGFR – от англ. platelet-derived growth factor receptor – рецептор фактора роста тромбоцитов

<sup>&</sup>lt;sup>54</sup> SPARC – от англ. secreted protein, acidic and rich in cysteine – секретируемый белок, кислый и богатый цистеином. Внеклеточный, Ca<sup>2+-</sup>связывающий матриксный гликопротеин

адгезивных межклеточных контактов, в частности, их компонентов – катенинов, для сборки плотных контактов [204]. Механизмы, определяющие это участие, состоят в регуляции актинового цитоскелета, активности Rho ГТФаз, поддержания полярности и предоставления платформы для трафика компонентов плотных контактов к мембране [205]. Аналогичный механизм был показан и для щелевых контактов [206]. фокальных контактов было показано, что Для адгезивных и увеличение механического воздействия на один тип контактов снижает это воздействие в другом, то есть сильная адгезия к ВКМ снижает прочность адгезивных контактов между клетками и наоборот, что важно для коллективной миграции клеток [121]. Для десмосом их перекрестное взаимодействие со всеми остальными типами межклеточных контактов осуществляется за счет сигнальных функций десмоглеинов и десмоколлинов и состоит в активации или подавлении экспрессии компонентов контактов [207].

#### 1.3.7. Перекрестные взаимодействия белков контактов с HER2

HER2 <sup>55</sup> – представитель семейства Онкомаркер трансмембранных тирозинкиназ, рецепторов эпидермального фактора роста EGFR. Типичное строение этих тирозинкиназ включает: связывающийся с фактором роста внеклеточный трансмембранный домен, внутриклеточный каталитический домен. домен с С-концевой тирозинкиназной активностью И тирозин-содержащий цитоплазматический хвост. В случае других представителей этого семейства, белков HER1, HER3 и HER4 связывание с лигандом вызывает изменение конформации внеклеточного домена рецептора, что индуцирует его гомоили гетеродимеризацию, приводящую к активации внутриклеточного тирозинкиназного домена. Автофосфорилирование определенных участков цитоплазматического хвоста запускает сигнальные каскады в клетке, конечной мишенью которых являются факторы транскрипции и репрессоры, участвующие в регуляции

<sup>&</sup>lt;sup>55</sup> HER2 – от англ. human epidermal growth factor receptor 2 – человеческий рецептор эпидермальнго фактора роста 2

экспрессии генов, отвечающих за регуляцию транскрипции, клеточного цикла и апоптоза, реорганизацию цитоскелета, дифференцировку и миграцию [208].

HER2 – единственный представитель семейства, для которого не обнаружено специфического лиганда. Он выступает как димеризационный партнер. Стабильность гетеродимеров, содержащих HER2, гораздо выше, чем у димеров других представителей семейства, так как для них характерна низкая лигандспецифичность, большее время жизни комплекса рецептор-лиганд, медленный эндоцитоз, медленная деградация димера и быстрая его рециркуляция, что обусловливает индукцию сильного и стабильного сигнала. В нормальных эпителиальных клетках количество молекул HER2 очень мало, однако при злокачественной трансформации клеток его количество резко возрастает [209].

Высокая экспрессия HER2 и связанные с ней адаптивные механизмы, используемые опухолевыми клетками для выживания, могут включать и взаимосвязь с белками контактов. Показано, что высокая экспрессия HER2 обусловливает миграцию клеток карциномы молочной железы за счет повышения регуляции активирующего транскрипционного фактора 4, который, в свою очередь, вызывает активацию ZEB1 и подавляет экспрессию Е-кадгерина [210]. На фоне высокой экспрессии HER2 N-кадгерин активирует FGFR, что может приводить к ЭМП и приобретению клетками стволовых черт за счет фосфорилирования Erk и Akt [211].

В случае белков плотных контактов (клаудинов) были предприняты попытки расширить типирование опухолей молочной железы на основе оценки одновременной представленности HER2 и потери клаудинов (claudin-low phenotype). Однако вследствие того, что экспрессия некоторых клаудинов возрастает при высокой экспрессии HER2 (например, клаудина 4), выделение дополнительного фенотипа в настоящий момент ставится под сомнение [212]. Кроме того, присутствие HER2 необходимо для правильной локализации ZO-1 в плотном контакте [213].

В отношении белков десмосом показано, что высокая экспрессия HER2 ассоциируется с потерей десмоглеина-3 [214]И усилением экспрессии десмоколлина-2 в метастазах рака молочной железы по сравнению с первичной опухолью [170]. Может наблюдаться и функциональное взаимодействие HER2 и белков десмосом. Так, контакты на основе десмоглеина-2 способны экранировать рецептор HER2 от воздействия таргетных агентов, что вносит вклад в устойчивость к ним [215]. Растворимая форма десмоглеина-2, а именно его внеклеточный домен, активирует фосфорилирование HER2 и HER3, что приводит у усилению пролиферации клеток за счет активации сигнальных путей Akt/mTOR<sup>56</sup> и MAPK [216].

Показано, что при сверхэкспрессии HER2 клетки аденокарциномы молочной железы полностью теряют коммуникацию за счет щелевых контактов на основе коннексина-43, причем этот феномен наблюдается в клетках как устойчивой, так и терапии восприимчивой к линии. Интересно, что при искусственной сверхэкспрессии коннексина-43 в этих линиях клетки линии, восприимчивой к терапии, формируют полноценные щелевые контакты, в то время как в клетках устойчивой линии коннексин-43 характеризуется внутриклеточной локализацией, что еще более усиливвет их пролиферацию и миграцию [217]. Для коннексина-32 продемонстрирована способность подавлять активацию HER2 в клетках карциномы почки за счет неканальных функций [218].

Перекрестное взаимодействие HER2 с интегринами, вероятно, сильно зависит от контекста. Так, в привитых опухолях молочной железы на основе клеточных линий со сверхэкспрессией HER2 потеря α3β1-интегрина приводила к усилению агрессивности их фенотипа: ускорению роста опухолей, их усиленной васкуляризации, метастазированию в легкие [219]. В то же время при раке желудка HER2 запускал экспрессию интегрина-β5 по пути PI3k-Akt в метастазах в печени

<sup>&</sup>lt;sup>56</sup> mTOR – от англ. mammalian target of rapamycin – мишень рапамицина млекопитающих. Серин-треониновая киназа, которая регулирует рост и выживание клеток

[220], а в опухоли молочной железы с высокой экспрессией HER2 при взаимодействии интегрина-β1 с коллагеном II типа запускался сигнальный каскад по пути Src, что приводило к развитию устойчивости к сочетанной терапии против HER2 и PI3k [221].

Суммируя описанные сведения, можно видеть, что белки межклеточных контактов и контактов клетка-матрикс широко вовлечены в регуляцию жизненноважных процессов в клетках. Более глубокое изучение перекрестных взаимодействий белков контактов различных типов между собой и с рецепторами факторов роста представляет большой интерес, так как позволит более точно охарактеризовать механизмы, по которым адгезивное поведение клетки формирует ее фенотип, в том числе и в условиях патологических процессов.

#### ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 2.1. Клеточные линии

Для выполнения исследований были выбраны клетки линии аденокарциномы яичника человека SKOV-3 и ее производных. Оригинальная клеточная линия SKOV-3 была получена из асцита пациента и характеризуется гиперэкспрессией рецептораонкомаркера HER2 [222]. Для проведения экспериментов клетки были получены из коллекции клеточных культур Института биохимии РАН. В экспериментах с исследованием проникновения противоопухолевых агентов в глубину вглубь сфероидов использовали клетки линии SKOV-3-kat, стабильно экспрессирующие красный флуоресцентный белок TubroFP635 ( $\lambda_{ex}$  588 нм,  $\lambda_{em}$  635 нм) [223]. В экспериментах по исследованию представленности белков межклеточных контактов использовали клетки линии SKOV-3.ip, полученные путем интраперитонеальной инъекции клеток линии SKOV-3 иммунодефицитным мышам с последующим сбором клеток из образующегося асцита и отличающиеся, по данным литературы, более высоким уровнем экспрессии HER2 и более выраженным метастатическим потенциалом [224].

Культивирование клеток производили в среде ДМЕМ<sup>57</sup>, содержащей 1,5 мМ глутамина (ПанЭко, Россия), с добавлением 10% (v/v) эмбриональной сыворотки теленка (HyClone, США) и 50 мкг/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Москва, Россия) при 37°С в атмосфере 5% СО<sub>2</sub>. Пассирование клеток производили снятием с подложки с помощью раствора Версена (ПанЭко, Россия).

#### 2.2. Получение сфероидов и их характеристика

Для получения сфероидов использовали 96-луночные планшеты из низкоадгезивного пластика с круглым дном (Corning, США). Для оценки динамики роста сфероидов проводили мониторинг их развития при различной плотности посадки в лунки планшета (200, 500 и 1000 кл./лунку). Изображения сфероидов

<sup>&</sup>lt;sup>57</sup> ДМЕМ – от англ. Dulbecco's modified Eagles medium – модифицированная Дульбекко среда Игла

получали с использованием инвертированного микроскопа Axiovert 200 с объективом EC PlanNeofluar 10×/0.3 (Carl Zeiss, Германия) методом фазового контраста. Объем каждого сфероида (V, мкм<sup>3</sup>) рассчитывали по формуле объема эллипсоида:

$$V = a \times b^2 / 2 , \tag{1}$$

где *а* – больший диаметр (мкм), *b* – меньший диаметр (мкм).

Для морфологического исследования сфероидов использовали набор для гистологической проводки (Астромед, Россия) ручной В соответствии С рекомендациями производителя. От сфероидов отбирали ростовую среду, после чего сфероиды дегидратировали сначала в этаноле возрастающей концентрации (70, 80, 95 %) в течение 5 мин против трех смен каждого раствора, а затем по 10 мин в смеси 95% этанол/ксилол (1:1) и в чистом ксилоле. Дегидратированные сфероиды заключали в парафиновый блок, после застывания которого получали срезы толщиной 7-10 мкм с помощью микротома Microm HM 325 (Thermo Scientific, США). Срезы помещали на высокоадгезивные предметные стекла Menzel-Glaser Superfrost ultra plus (Thermo Scientific, США), сушили. Полученные препараты депарафинизировали последовательной инкубацией в течение 2 мин в ксилоле и 96% этаноле против двух смен каждого спирта, после чего отмывали по 2 мин в 70% этаноле и дистиллированной воде.

Флуоресцентное окрашивание препаратов производили в темноте. Инкубировали препараты 5 мин в цитратном буфере (26,5 мл 0,2 М CH<sub>3</sub>COONa + 73,5 мл 0,2 М CH<sub>3</sub>COOH, pH 4,2), затем наносили на срез свежеприготовленный раствор 0,5 мг/мл акридинового оранжевого в цитратном буфере (ПанЭко, Россия) и инкубировали 15 мин, после чего 2 раза отмывали цитратным буфером по 5 мин и сушили. Препарат заключали под покровное стекло с помощью монтирующей среды Shandon Immu-Mount (Thermo Scientific, США). Изображения срезов получали с использованием лазерного сканирующего микроскопа Axio Observer Z1 LSM 710 NLO/Duo (Carl Zeiss, Германия) с объективом ЕС Plan-Neofluar 20×/0.5. Для визуализации акридинового оранжевого и флуоресцентного белка TurboFP635 использовали, соответственно, лазер 458 нм и диапазон регистрации 505-552 нм, лазер 594 нм и диапазон регистрации 600-740 нм.

#### 2.3. Получение моделей опухоли in vivo

Ксенографтные модели опухоли получали в иммунодефицитных мышах линии Balb/c nude возрастом 6-8 недель. Животные содержались в вентилируемых клетках из полистирола с циркадным режимом 12/12 ч, с питанием и доступом к воде *ad libitum*. Проведение экспериментов было одобрено биоэтической комиссией ННГУ (протокол №21 от 22.10.2018).

Путем инъекции опухолевых клеток получали подкожную (750 тыс. клеток в 50 мкл фосфатно-солевого буфера в заднюю лапу) и интраперитонеальную (3 млн. клеток в 200 мкл фосфатно-солевого буфера) модели опухоли. Для оценки профиля представленности белков межклеточных контактов животных выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации на 21-23 сутки роста опухоли. В случае подкожно привитой опухоли её объем составлял ~ 250 мм<sup>3</sup>, в случае интраперитонеальных опухолей объем и количество узлов оценивали *post mortem*.

### 2.4. Получение рекомбинантного таргетного токсина DARPin-LoPE<sup>58</sup>

Получение и очистку DARPin-LoPE осуществляли по методике, описанной в [225]. Клетки *E. coli* линии BL21(DE3) трансформировали вектором pDARP-LoPE, в котором ген целевого белка находится под контролем промотора T7. Для этого получали компетентные клетки: стерильную жидкую среду YTPS<sup>59</sup> (1% триптон, 1% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl, 80 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) заражали колонией BL21(DE3) и инкубировали при температуре 37°C и постоянном перемешивании до достижения оптической плотности OD<sub>600</sub> = 0,6, что для данной культуры соответствует логарифмической фазе роста. После этого клетки последовательно

<sup>&</sup>lt;sup>58</sup> DARPin-LoPE – от англ. designed ankyrin repeat protein – low-immunogenic *Pseudomonas* exotoxin

<sup>&</sup>lt;sup>59</sup> YTPS – от англ. yeast, triptone, phosphate, sodium – дрожжи, триптон, фосфат, натрий

инкубировали в растворе №1 (50 мМ CaCl<sub>2</sub>, 10мМ MgCl<sub>2</sub>) и растворе №2 (50 мМ CaCl<sub>2</sub>) по 30 мин при температуре +4°С. Далее к ним добавляли вектор pDARP-LoPE в количестве 0,5 нг и клетки инкубировали 40 минут при температуре +4°С. По прошествии инкубации клетки в суспензии подвергали тепловому шоку в течение 1 мин при +42°С, после чего производили селекцию трансформантов на LB-агаре, содержащем ампициллин в концентрации 0,1 г/л.

Стерильную среду YPTS заражали свежими трансформантами и наращивали до оптической плотности  $OD_{600}$ = 0,6, после чего для индукции синтеза DARPin-LoPE добавляли 1 мМ ИПТГ<sup>60</sup> и суспензию культивировали в течение 12 часов при 28°С. Все дальнейшие манипуляции по экстрагированию белка из клеток и его очистке проводили при +4°С. Осадок бактериальной массы ресуспендировали в связывающем буфере (20 мМ Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 20 мМ имидазол, pH 7,4), после чего бактерии разрушали ультразвуком, клеточный дебрис удаляли, а полученный лизат фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм (Millipore, США).

В составе DARPin-LoPE присутствует гексагистидиновая последовательность, что позволяет проводить первичную очистку белка методом металл-хелатной хроматографии за счет связывания гексагистидиновой последовательности с иммобилизованными на носителе ионами Ni<sup>2+</sup>. Колонку HisTrap FF 5 ml (GE Healthcare, США) уравновешивали 5 объемами колонки связывающего буфера на скорости 5 мл/мин. После этого при той же скорости наносили лизат, а затем производили промывку колонки связывающим буфером в количестве 5 объемов DARPin-LoPE с колонки Элюирование производили колонки. градиентом концентрации элюирующего буфера (20 мМ Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 500 мМ имидазол, рН 7,4). Максимально насыщенные фракции очищенного белка объединяли, концентрировали, после чего белок дополнительно очищали методом гельфильтрации. Для этого его переводили в буферный раствор состава (50 мМ Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 мМ NaCl) и наносили на колонку Superdex 200 (GE Healthcare, США),

<sup>&</sup>lt;sup>60</sup> ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид

уравновешенную тем же буфером, где разделение происходит на основе молекулярной массы белков в смеси.

#### 2.5. Аутентификация DARPin-LoPE

Присутствие белка в образцах оценивали методом вестерн-блота. Для этого проводили электрофоретическое исследование очищенной фракции белка в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях [226]. Образцы готовили путем смешивания 15 мкл фракции интереса и 5 мкл 4-кратного буфера Лэммли состава: 20 мМ трис (pH 6,8), 4%  $SDS^{61}$ , 40% глицерин, 1% бромфеноловый синий, 400 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол) и последующего кипячения в течение 5 минут. Разделение белков осуществляли в гелях состава: разрешающий гель 12,5% (12,5% акриламид / 1% N,N'-метилен-бис-акриламид , 375 мМ трис (pH 8,8), 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,01% ТЕМЕD); концентрирующий гель 5% (5% акриламид / 1% N,N'-метилен-бис-акриламид, 125мМ трис (pH 6,8), 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,01% ТЕМЕD). В качестве метчика был использован неокрашенный маркер Page Ruler unstained protein ladder (ThermoScientific, США) с диапазоном молекулярных масс 10 – 200 кДа. Разделение белков в геле осуществляли при постоянной силе тока 60 мА с помощью камеры Mini Protean Tetra (BioRad, CША).

Поливинилиденфторидную мембрану Immobilon-P (Millipore, США) активировали в метаноле, и уравновешивали в буфере для переноса (192 мМ глицин, 25 мМ трис, 20% этанол). Перенос белков с геля на мембрану проводили в течение 40 мин при постоянном напряжении 6 В и силе тока 60 мА (Trans-Blot Turbo Transfer System, BioRad, США).

После переноса мембрану блокировали в течение 1 часа в 3% растворе обезжиренного сухого молока (Applichem, Германия) на TBS (tris buffer solution) (50 мМ трис, 500 мМ NaCl, pH 7,0). Отмывку мембраны от излишков молока (как и все последующие отмывки) производили с помощью TBS троекратно по 5 минут.

<sup>&</sup>lt;sup>61</sup> SDS – от англ. sodium dodecyl sulphate – додецилсульфат натрия

После этого мембрану последовательно инкубировали по 1 часу при комнатной температуре с антителами, специфичными к гексагистидиновой последовательности (мышиные моноклональные анти-His6 IgG (Pierce)), разведенными в 2000 раз в 0,5% растворе молока в TBS, а затем с вторичными антителами (козьи поликлональные антимышиные IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (BD Pharmingen, США)) в том же разведении.

Для результатов вестерн-блота мембрану проявки выдерживали В коммерческом растворе, содержащем субстрат для пероксидазы хрена Clarity Western ECL Substrate (BioRad, CША), детекцию окрашенных полос осуществляли по интенсивности хемилюминесценции окрашенных полос уровню С использованием имиджинговой системы ChemiDoc (BioRad, CША).

#### 2.6. Анализ цитотоксичности DARPin-LoPE и доксорубицина

Для оценки цитотоксичности исследуемых агентов в отношении монослойной SKOV-3-kat высевали 2000 кл./лунку 96-луночного культуры клетки ПО культурального планшета (Corning, США) и культивировали в течение ночи. Затем ростовую среду в лунках заменяли свежей, содержащей DARPin-LoPE в диапазоне концентраций 10<sup>-5</sup>-10<sup>3</sup> нМ или доксорубицин в диапазоне концентраций 0,027-20 мкМ, после чего клетки инкубировали в течение 72 ч. Жизнеспособность клеток оценивали методом МТТ-теста. Данный метод основан на способности НАДФ-Нзависимых клеточных оксидоредуктаз восстанавливать тетразолиевый краситель МТТ<sup>62</sup> (желтого цвета) в нерастворимый формазан (кристаллы пурпурного цвета). Чем больше жизнеспособных клеток в культуре, тем интенсивнее будет окрашивание раствора при растворении кристаллов [227]. Для проведения МТТтеста ростовую среду в лунках заменяли свежей, содержащей 0,5 мг/мл (Alfa Aesar, Великобритания), и инкубировали клетки в течение 4 ч. Образовавшиеся кристаллы

<sup>&</sup>lt;sup>62</sup> МТТ – от англ. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5дифенил-тетразолиум бромид

формазана растворяли в ДМСО<sup>63</sup> (ПанЭко, Россия). Оптическую плотность в лунках измеряли при 570 нм с помощью планшетного спектрофотометра Synergy MX США). (BioTek, Относительную жизнеспособность клеток вычисляли как процентное отношение усредненной оптической плотности В лунках С обработанными клетками к усредненной оптической плотности в контрольных лунках.

Для оценки цитотоксичности исследуемых агентов в отношении сфероидов клетки SKOV-3-kat высевали в планшет из низкоадгезивного пластика (Corning, США) в количестве 1000 кл./лунку и инкубировали в течение 4 суток для формирования сфероидов. Затем заменяли ростовую среду в лунках свежей, содержащей DARPin-LoPE или доксорубицин, и инкубировали в течение 72 часов. Получали изображения сфероидов с помощью инвертированного микроскопа Axiovert 200 с объективом EC PlanNeofluar 10×/0.3 (Carl Zeiss, Германия). Относительную жизнеспособность клеток в сфероидах оценивали как процентное отношение усредненных объемов обработанных и контрольных сфероидов. Значение IC<sub>50</sub> рассчитывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad нелинейной Software, CШA) методом регрессии с использованием четырехпараметрической модели доза-эффект. Сравнение кривых ингибирующего эффекта для монослойной культуры и сфероидов осуществлялось с применением критерия Фишера, различия считались статистически значимыми при уровне значимости p < 0,05.

Чтобы подтвердить правомочность сравнения эффекта ингибирования, оцененного методом МТТ-теста для монослойной культуры и методом измерения объема для сфероидов, была проведена оценка ингибирующего эффекта доксорубицина в отношении сфероидов методом МТТ-теста и методом измерения объема и проведен корреляционный анализ.

<sup>&</sup>lt;sup>63</sup> ДМСО – диметилсульфоксид

### 2.7. Флуоресцентное мечение DARPin-LoPE и БСА

Флуоресцентное мечение рекомбинантного белка DARPin-LoPE проводили аминореактивными красителями FITC или DyLight650 NHS Ester (ThermoFisher Scientific, США), связывающимся с первичными аминогруппами. Флуоресцентное мечение БСА<sup>64</sup> проводили красителем FITC. Для конъюгации белок переводили в боратный буфер (400 мМ H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 70 мМ Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, pH 8,0) методом гель-фильтрации с использованием колонки PD SpinTrap G-25 (GE Healthcare, CША) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Затем инкубировали с 30-кратным молярным избытком FITC или с 7-кратным молярным избытком DyLight650 при комнатной температуре в темноте в течение 1 ч. Полученные конъюгаты DARPin-LoPE-FITC, DARPin-LoPE-DyLight650 или БСА-FITC очищали от несвязанного красителя переводом в PBS методом гель-фильтрации с помощью колонки PD США) SpinTrap G-25 (GE Healthcare, В соответствии С протоколом, рекомендованным производителем.

# 2.8. Оценка глубины проникновения доксорубицина, DARPin-LoPE и БСА в сфероид

Для визуализации проникновения противоопухолевых агентов в сфероид были получены единичные сфероиды из клеток линии SKOV-3-kat в лунках планшета из низкоадгезивного пластика при плотности посадки 2000 кл./лунку и времени формирования 4 суток. Сфероиды инкубировали в течение 2, 12 или 24 ч в ростовой среде, содержащей 1 мкМ DARPin-LoPE-FITC, или 1 мкМ DARPin-LoPE-DyLight650, или 1 мкМ БСА-FITC, или 10 мкМ доксорубицина. По истечении времени инкубации сфероиды дважды промывали PBS, затем фиксировали в растворе 4% формальдегида в PBS в течение 15 мин в темноте. Изображения сфероидов получали с помощью лазерного сканирующего микроскопа Axio Observer Z1 LSM 710 NLO/Duo (Carl Zeiss, Германия) с объективом EC Plan-Neofluar 20×/0.50.

<sup>&</sup>lt;sup>64</sup> БСА – бычий сывороточный альбумин

Для визуализации красителя FITC и доксорубицина использовали лазер 488 нм и диапазон регистрации флуоресценции 500-560 нм и 517-614 нм, соответственно. Для визуализации флуоресцентного белка TurboFP635 и красителя DyLight650 использовали, соответственно: лазер 594 нм и диапазон регистрации флуоресценции 600-740 нм, лазер 633 нм и диапазон регистрации флуоресценции 653-730 нм.

## 2.9. Анализ представленности белков межклеточных контактов, виментина, интегрина β1 и рецептора HER2

Анализ представленности белков межклеточных контактов (Е-кадгерина, десмоглеина-2, окклюдина, ZO-1, коннексина-43), белка промежуточных филаментов виментина, белка контактов клетка-матрикс интегрина β1 и рецептора онкомаркера HER2 проводили методом проточной цитофлуориметрии. Исследование проводили на линиях клеток SKOV-3 и SKOV-3.ip, выращенных в виде монослойной культуры, сфероидов или в виде опухолей, привитых иммунодефицитным мышам линии Balb/c nude. Все модели дезагрегировали для получения клеточных суспензий. Клетки, выращенные в монослое, а также сфероиды отделяли от субстрата и дезагрегировали раствором TrypLE (Thermo Fischer Scientific, США) в течение 20 мин при 37°С в 5% СО<sub>2</sub> в соответствии с протоколом производителя. Дезагрегирование опухолей проводили следующим образом: опухолевый узел измельчали с помощью скальпеля, полученные фрагменты опухоли выдерживали в 1% растворе коллагеназы (Gibco, CША) в среде ДМЕМ в течение 1 ч с добавлением 1/10 объемной доли TrypLE, после чего отделяли единичные клетки последовательно с использованием клеточных сит с диаметром пор 70 и 40 мкм [228].

Клетки тщательно промывали PBS (ПанЭко, Москва, Россия), последовательно фиксировали в 4% формальдегиде и затем пермеабилизировали в 0,02% Triton X-100 в течение 20 мин при комнатной температуре. Между этапами фиксации и пермеабилизации клетки также тщательно промывали PBS. Затем клетки

блокировали в растворе 3% молока (Applichem, Германия) в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего инкубировали с антителами против белков интереса и антителами соответствующего изотипического контроля в соответствии с Были использованы инструкциями производителя. следующие антитела: моноклональное антитело к Е-кадгерину (67А4), FITC; моноклональное антитело к окклюдину (OC-3F10), FITC; моноклональное антитело к коннексину-43 (CX-1B1), Alexa Fluor 488; моноклональное антитело к десмоглеину-2 (CSTEM28), Alexa Fluor 488; моноклональное антитело к ZO-1 (ZO1-1A12), Alexa Fluor 647; моноклональное антитело к интегрину  $\beta 1$  (TS2/16), PE; моноклональное антитело к виментину (VI-RE/1), РЕ и моноклональное антитело к рецептору HER2 (2G11), FITC. Все использованные антитела произведены Thermo Fischer Scientific, США. Окрашенные клетки промывали 1% раствором БСА (Sigma-Aldrich, США) в PBS и анализировали с помощью цитометра FACSAria III (Becton Dickinson, США) при исследовании представленности белков контактов в монослойной культуре и сфероидах в рамках сравнения этих двух моделей. Исследование локализации коннексина-43 и исследование представленности белков контактов в сфероидах и моделях опухоли *in* vivo проводили с использованием цитометра BC CytoFlex S (Beckman Coulter, CША). Флуоресценцию FITC и AlexaFluor488 возбуждали лазером с длиной волны 488 нм, сигнал регистрировали в диапазоне 515–545 нм; флуоресценцию AlexaFluor647 и возбуждали лазером с длиной волны 633 нм, и сигнал регистрировали в диапазоне 650-670 нм; флуоресценцию РЕ возбуждали лазером с длиной волны 488 нм, и сигнал регистрировали в диапазоне 564-606 нм. В каждом образце было зарегистрировано не менее 10<sup>4</sup> событий. Каждый эксперимент повторен независимо не менее трех раз. Исследование представленности белков интереса in vivo проводили для групп из трех животных.

Уровень представленности исследуемых белков определяли как соотношение интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных специфическими антителами к белку интереса, к интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных антителами

изотипического контроля; этот показатель обозначен как относительная флуоресценция. Значение относительной флуоресценции, равное 1, соответствует отсутствию в клетках белка интереса.

Для оценки локализации коннексина-43 в клетках была проведена их окраска специфическими антителами в пермеабилизованном состоянии (для оценки общей представленности) и в непермеабилизованном (для оценки представленности поверхностно локализованного белка).

#### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Получение трехмерной модели аденокарциномы яичника *in vitro*

В данной работе исследованы потенциальные механизмы формирования лекарственной устойчивости опухолевых клеток при формировании ими трехмерной структуры. Исследования проводились с использованием клеток родственных линий аденокарциномы яичника человека, на основе которых были получены трехмерные модели опухоли *in vitro* – сфероиды. Сфероиды – одна из самых простых трехмерных моделей опухоли *in vitro*, в то же время она до некоторой степени отражает условия микроокружения в опухоли благодаря наличию градиентов газов, питательных веществ и метаболитов, а также наличию межклеточных контактов, что может отражать аваскулярную стадию опухоли или зону опухоли, удаленную от сосуда [229,230]. Кроме того, для опухолей яичника показано, что процесс метастазирования характерен для продвинутых стадий опухолевого процесса и происходит преимущественно за счет отщепления сфероидов от первичного опухолевого узла. Далее сфероиды могут существовать как в виде свободных микрометастазов в перитонеальной жидкости, так и прикрепляться к мезотелию, что способствует развитию перитонеального карциноматоза [231].

Подбор условий культивирования сфероидов был проведен на линии клеток аденокарциномы яичника человека SKOV-3-kat. Для получения сфероидов был выбран способ ИХ выращивания В круглодонных лунках планшета ИЗ низкоадгезивного пластика, позволяющий получение единичных сфероидов [232]. Сфероиды из клеток линии SKOV-3-kat формировались на 4-й день после посадки клеток в планшет и представляли собой округлые рыхлые конгломераты клеток (рис. 7А). На рисунке 7Б представлены усредненные кривые роста сфероидов: видно, что при низкой плотности посадки (200 кл./лунку) динамика роста сфероидов близка к линейной, в то время как при больших плотностях (500 и 1000 кл./лунку) динамика их роста приобретает более сложный характер, описываемый сигмоидой, с характерным выходом на плато. Подобная динамика рассматривается как присущая

росту опухолей *in vivo* [233]. Замедление роста сфероида с течением времени может быть вызвано возрастающей ролью гипоксии и недостаточным поступлением питательных веществ внутрь сфероида по мере увеличения его размеров, что, в конечном итоге, приводит к формированию некротического ядра в сфероиде [234].



Рис. 7. Получение и характеристика сфероидов аденокарциномы яичника человека SKOV-3-kat.
А, Морфология сфероидов SKOV-3-kat на разные дни роста. Размер изображений 550×550 мкм.
Б, Кривые роста сфероидов SKOV-3-kat, полученных при разной плотности посадки клеток. День «0» – посадка клеток в планшет.

**В**, Конфокальная микроскопия срезов сфероидов SKOV-kat на 8-й день роста (окраска акридиновым оранжевым). Представлены изображения в проходящем свете, в каналах регистрации флуоресценции акридинового оранжевого (λех 458 нм, λет 505-552 нм) и флуоресцентного белка TurboFP635 (λех 594 нм, λет 600-740 нм), а также наложенные изображения в двух каналах. Размер изображений 707×707 мкм

Для оценки морфологии сфероидов SKOV-3-kat нами было проведено исследование срезов сфероидов возрастом 8 дней, окрашенных акридиновым оранжевым, связывающимся с двунитевыми нуклеиновыми кислотами (рис. 7В): равномерная флуоресценция в каналах регистрации флуоресценции акридинового

оранжевого (зеленый) и белка TurboFP635 (красный) по всей глубине сфероида свидетельствует о жизнеспособности клеток всех слоев сфероида и отсутствии некротического ядра в центре. Поскольку влияние терапевтических агентов более корректно оценивать в фазе активного роста сфероида, последующие эксперименты проводились до 8-го дня роста сфероидов.

## 3.2. Цитотоксичность доксорубицина и DARPin-LoPE в отношении монослойной культуры и сфероидов *in vitro*

В ходе работы был проведен анализ чувствительности клеток аденокарциномы яичника к терапевтическим агентам различной природы: цитостатическому антибиотику доксорубицину и рекомбинантному таргетному противоопухолевому токсину DARPin-LoPE. Доксорубицин принадлежит к антибиотикам антрациклинового ряда и его действие основано на встраивании в молекулу ДНК и блокировании работы топоизомеразы II, что приводит к нарушению процесса репликации и последующему прекращению синтеза белка [235]. Кроме того, описано, что доксорубицин повышает выработку хиноновых радикалов, которые вносят вклад в токсичность доксорубицина за счет повреждения клеточных мембран [236].

Таргетный токсин DARPin-LoPE представляет собой бифункциональную молекулу, которая способна связываться с мишенью на поверхности опухолевой клетки и вызывать ее гибель. Специфическое нацеливание DARPin-LoPE адресного модуля неиммуноглобулиновой реализуется счет природы за DARPin9\_29, который распознает субдомен I внеклеточного домена рецептора HER2 действие [237]. Токсическое DARPin-LoPE обеспечивается за счет низкоиммуногенного фрагмента псевдомонадного экзотоксина А, LoPE, у которого удалены Т-клеточные [225]. И В-клеточные эпитопы Принцип действия псевдомонадного экзотоксина и его фрагментов состоит в том, что после проникновения токсического модуля в клетку происходит его ретроградный

транспорт в аппарат Гольджи, а затем в эндоплазматический ретикулум, за счет наличия в его составе последовательности KDEL<sup>65</sup>. Во время транспорта происходит ферментативное расщепление токсина и высвобождение активного токсического домена. При выходе в цитоплазму через транслокон ЭПР токсический домен производит АДФ-рибозилирование гистидина, входящего в состав высококонсервативного участка фактора элонгации трансляции (EF2). Это делает невозможным связывание EF2 с рибосомой, в результате чего происходит необратимое блокирование трансляции белка с последующей гибелью клетки [238].

Для исследования цитотоксичности исследуемых агентов в отношении монослойной культуры использовали стандартный МТТ-тест [227]. В качестве подхода для оценки влияния исследуемых агентов на рост сфероидов анализировали объема сфероидов изменение относительно контроля. В предварительных экспериментах было показано, ЧТО результаты, полученные при анализе относительной жизнеспособности клеток в сфероидах методом МТТ-теста МТТ, и при расчете относительного объема сфероидов хорошо согласуются друг с другом (рис. 8). Значение коэффициента корреляции Пирсона составило r = 0,97 при p<0,0001.



Рис. 8. Сопоставление результатов оценки цитотоксичности доксорубицина с использованием двух подходов: с помощью стандартного МТТ-теста («МТТ») и на основании размеров сфероидов момент окончания на инкубации исследуемым c агентом («V»). Сфероиды инкубировались в присутствии доксорубицина в течение 7 суток.

<sup>&</sup>lt;sup>65</sup> KDEL – последовательность аминокислот лизин-аспарагиновая кислота-глутаминовая кислота-лейцин



**Рис. 9.** Ингибирующий эффект DARPin-LoPE и доксорубицина в отношении клеток линии SKOV-3-kat, культивированных в виде сфероидов (светлоокрашенные кривые) и монослойной культуры (темноокрашенные кривые) после инкубации в присутствии исследуемых агентов в течение 72 ч. \* – значимое отличие кривых ингибирующего эффекта исследуемых агентов в отношении монослойной культуры и сфероидов, критерий Фишера, р < 0,05).

А, Ингибирующий эффект DARPin-LoPE.

Б, Ингибирующий эффект доксорубицина

Результаты исследования эффективности токсического действия DARPin-LoPE в отношении монослойной культуры и сфероидов SKOV-3-kat показали, что жизнеспособность клеток монослойной культуры значительно снижалась уже при пикомолярных концентрациях таргетного токсина DARPin-LoPE (IC<sub>50</sub> 0,6 нМ), в то время как существенного ингибирования роста сфероидов не удалось достичь даже при концентрациях DARPin-LoPE порядка 1 мкМ (рис. 9А). Степень выраженности эффекта доксорубицина также варьировала в монослойной культуре и сфероидах, однако обнаруженные различия оказались не такими существенными, как в случае таргетного токсина): рассчитанные значения IC<sub>50</sub> доксорубицина для клеток монослойной культуры и сфероидов различались менее, чем на порядок (177 нМ для монослоя и 774 нМ для сфероидов) (рис. 9Б). Тем не менее, эти различия также были статистически значимы.

Развитие устойчивости опухолевых клеток при переходе к трехмерному культивированию уже регистрировалось в литературе как для высоко-, так и для низкомолекулярных агентов (таблица 1). Так, данные демонстрируют, что как для высоко- так и для низкомолекулярных агентов часто характерно повышение полумаксимальных ингибирующих концентраций в отношении трехмерных моделей по сравнению с монослойной культурой от одного до нескольких порядков, однако описаны случаи и значительно более выраженной устойчивости, в частности для доцетаксела [239]. Интересно отметить, что так как высокомолекулярные агенты часто представляют собой высокоспецифичные таргетные агенты, то их IC<sub>50</sub> лежат пико- и наномолярном диапазоне, в то время как для низкомолекулярных химиотерапевтических агентов IC<sub>50</sub> лежат преимущественно в микромолярном диапазоне.

Исследование эффективности DARPin-LoPE в отношении интраперитонеально привитой аденокарциномы яичника человека показало, что его концентрация, эффективно замедляющая рост опухоли в мышах-опухоленосителях, составляет ~ 59,5 нМ, что на 2 порядка выше, чем в монослойной культуре [240].

### Таблица 1

ODOTITIO
лканикл
5 Dealine
<b>J</b> .

Противоопухолевый агент, Мг	Модель	IС <sub>50</sub> в 2D	IС <sub>50</sub> в 3D	Источник
Низкомолекулярные агенты				
5-Фторурацил	3D органоиды из клеток плоскоклеточной карциномы TE11	4,252 мкМ	15,31 мкМ	[2/1]
Mr 0,13 кДа				[241]
Доцетаксел	Микроагрегаты из клеток карциномы простаты LNCaP	11 нМ	4.3×10 <sup>8</sup> нМ	[230]
Mr 0,808 кДа				[239]
Паклитаксел,	Сфероиды из клеток карциномы яичника А2780	4 нМ	4408,6 нМ	
Mr 0,854 кДа				[242]
Цисплатин,		1,46 мкМ	14,4 мкМ	[242]
Mr 0,3 кДа				
Доксорубицин,	Сфероиды из клеток глиобластомы U-87 MG,	0,12 мкМ	80,4 мкМ	[2/2]
Mr 0,543 кДа	сформированные в присутствии RGD-пептидов			[243]
Сульфид мышьяка II,	Сфероиды из клеток аденокарциномы молочной железы	5,11 мкМ	15,65 мкМ	[244]
Mr 0,214 кДа	MCF-7			[244]
Винкристин,	Сфероиды нейробластомы BE(2)-С	21,8 нМ	211, нМ	[245]
Mr 0,825 кДа				[243]
Высокомолекулярные агенты				
Конъюгат цетуксимаб-ауристатин	Сфероиды из клеток карциномы кожи А431	51 пМ	791 пМ	[246]
$Mr \approx 149 \ \kappa Дa$				[240]
Токсический пептид vCPP2319	Сфероиды карциномы молочной железы MDA-MB-231	4,5 мкМ	22,1 мкМ	[247]
$Mr \approx 3 \ \kappa Дa$				[247]
Иммунотоксин SS1P	Сфероиды из клеток мезотелиомы NCI-M-13	~0,16 нМ	>15,8 нМ	[249]
$Mr \approx 63 \ \kappa Дa$				[248]
Конъюгат трастузумаб-эмтанзин,	Сфероиды из клеток карциномы молочной железы ВТ-474	1,2 нМ	46,3 нМ	[240]
$Mr \approx 145 $ кДа				[249]
Наночастицы PLGA, загруженные	Сфероиды из клеток карциномы аденокарциномы яичника	3 мкг/мл	117 мкг/мл	[250]
фталоцианином, D = $208 \pm 66$ нм	SKOV-3-kat			[230]

# 3.3. Анализ глубины и динамики проникновения DARPin-LoPE, БСА и доксорубицина в сфероид

Выявленное снижение эффективности доксорубицина и DARPin-LoPE в отношении клеток SKOV-3-kat при формировании ими трехмерной структуры согласуется с широко описанным в литературе явлением резистентности опухоли in vivo к действию противоопухолевых агентов по сравнению с монослойной культурой клеток. В условиях *in vivo* недостаточная эффективность лекарств может быть обусловлена проблемами их доставки в опухоль из-за неадекватного развития сосудистого русла и высокого интерстициального давления, которые затрудняют проникновение терапевтических агентов к глубоко залегающим клеточным слоям и способствуют их активному вымыванию [251,252]. Кроме того, важно учитывать и свойства самого агента (способность к диффузии, особенности механизма действия). Так, для иринотекана (неактивная форма) было показано, что, несмотря на то, что он проникает на всю глубину сфероида, его активная форма образуется лишь в клетках поверхностных слоев сфероида [253]. Для доксорубицина и многих других слабоосновных противоопухолевых агентов было показано, что при полном проникновении сфероид парацеллюлярному В ПО пути, они не ΜΟΓΥΤ интернализоваться в клетки, так как в условиях закисления переходят в протонированную форму [254,255].

Для оценки глубины проникновения исследуемых агентов сфероиды SKOV-3kat были проинкубированы в присутствии доксорубицина, обладающего собственной оранжево-красной флуоресценцией, и DARPin-LoPE, меченного флуоресцентным красителем FITC. Как видно на рисунке 10, для DARPin-LoPE, имеющего молекулярную массу 42 кДа, характерно медленное накопление в клетках лишь поверхностных слоев сфероида, с проникновением на глубину порядка 50-70 мкм (при диаметре сфероида около 300 мкм) в течение 24 часов инкубации (рис. 10). Низкомолекулярный агент доксорубицин (Mr 0,5 кДа) при аналогичных условиях интенсивно проникает практически на всю глубину сфероида (рис. 11).



**Рис. 10.** Динамика проникновения адресного токсина DARPin-LoPE, меченного флуоресцентным красителем FITC (DARPin-LoPE-FITC), в сфероиды SKOV-3-kat.

А, Конфокальная микроскопия сфероидов SKOV-3-kat в отсутствие DARPin-LoPE-FITC. Размер изображений 708×708 мкм.

**Б**, **В**, **Г**, Конфокальная микроскопия сфероидов SKOV-3-кат через 2, 12 и 24 часа инкубации в присутствии DARPin-LoPE-FITC (соответственно). Представлены изображения в проходящем свете и наложенные изображения в каналах регистрации флуоресценции FITC ( $\lambda_{ex}$  488 нм,  $\lambda_{em}$  500-560 нм) и флуоресцентного белка TurboFP635 ( $\lambda_{ex}$  594 нм,  $\lambda_{em}$  600-740 нм). Размер изображений 708×708 мкм.

Д, Профиль интенсивности флуоресцентного сигнала в канале FITC вдоль стрелки, отмеченной на изображении Г

Для таргетных агентов, характеризующихся высоким сродством к молекулярной мишени, может иметь место так называемый «барьер связывания». Этот эффект, заключается в стабильном связывании агента с рецепторамиантигенами опухолевых клеток по периферии опухоли, что ухудшает проникновение таких агентов в глубину опухолевой ткани и, как следствие, снижает их эффективность [256,257].



Рис. 11. Динамика проникновения доксорубицина в сфероиды SKOV-3-kat.

А, Конфокальная микроскопия сфероидов SKOV-3-kat в отсутствие доксорубицина. Размер изображений 708×708 мкм.

**Б**, **В**, **Г**, Конфокальная микроскопия сфероидов SKOV-3-kat через 2, 12 и 24 часов инкубации в присутствии доксорубицина (соответственно). Представлены изображения в проходящем свете и наложенные изображения в каналах регистрации флуоресценции доксорубицина ( $\lambda_{ex}$  488 нм,  $\lambda_{em}$  517-614 нм) и флуоресцентного белка TurboFP635 ( $\lambda_{ex}$  594 нм,  $\lambda_{em}$  600-740 нм). Размер изображений 708×708 мкм. Размер изображений 708×708 мкм.

Д, Профиль интенсивности флуоресцентного сигнала в канале FITC вдоль стрелки, отмеченной на избражении Г

Чтобы оценить возможное влияние данного эффекта на проникновение HER2специфичного таргетного токсина DARPin-LoPE, было исследовано проникновение FITC-меченного бычьего сывороточного альбумина (БСА), имеющего молекулярную массу того же порядка (66 кДа), но не обладающего специфичностью к HER2. Как видно на рисунке 12, БСА демонстрирует плохое проникновение в сфероид SKOV-3-kat, аналогично DARPin-LoPE. Таким образом, барьер связывания в данном случае не оказывает значительного влияния на глубину проникновения DARPin-LoPE.

В силу оптических особенностей биологической ткани (в частности, сильного поглощения и рассеяния синего и зеленого света), проникающая способность света видимого диапазона довольно сильно варьирует при переходе из синей в красную область спектра [258]. При визуализации сфероидов SKOV-3-kat, флуоресцирующих в красной области спектра за счет экспрессии флуоресцентного белка TurboFP635 ( $\lambda_{em}$  635 нм), была продемонстрирована возможность регистрации излучения этого диапазона длин волн из глубины сфероидов диаметром 300-500 мкм методом конфокальной микроскопии с использованием объектива с числовой апертурой 0.5 (рис. 10-12). В связи с этим, во избежание неверной трактовки результатов проникновения белковых молекул DARPin-LoPE и БСА, меченных зеленым красителем FITC, была проведена оценка проникновения DARPin-LoPE, меченного красным флуоресцентным красителем DyLight650, в сфероиды, полученные из клеток нефлуоресцирующей линии SKOV-3 (рис. 13). В этом случае динамика накопления DARPin-LoPE-DyLight была аналогична таковой для DARPin-LoPE-FITC: глубина проникновения к 24 часам инкубации не превышала 50-70 мкм.

Стоит отметить, что приводимые в литературе абсолютные значения глубины проникновения в опухоль различных противоопухолевых агентов существенно различаются. В случае моделей опухоли яичника на сфероидах линии SKOV-3.ip было показано плохое проникновение HER2-специфичного антитела пертузумаб (Mr 148 кДа) при инкубации в течение 24 ч, в то время как неспецифичное антитело
(IgG) близкой молекулярной массы быстро и эффективно диффундировало в глубь сфероида [259].





Рис. 12. Динамика проникновения бычьего сывороточного альбумина, меченного флуоресцентным красителем FITC (BSA-FITC), в сфероиды SKOV-3-kat.

А, Конфокальная микроскопия сфероидов SKOV-3-kat в контроле в отсутствие BSA-FITC. Размер изображений 698 × 698 мкм.

Б, В, Г, Конфокальная микроскопия сфероидов SKOV-3-kat через 2, 12 и 24 часов инкубации в присутствии BSA-FITC (соответственно). Представлены изображения в проходящем свете и наложенные изображения в каналах регистрации флуоресценции FITC (лех 488 нм, лет 500-560 нм) и флуоресцентного белка TurboFP635 (лех 594 нм, лет 600-740 нм). Размер изображений 698×698 мкм.

Д, Профиль интенсивности флуоресцентного сигнала в канале FITC вдоль стрелки, отмеченной на изображении Г



**Рис.** 13. Проникновение рекомбинантного таргетного токсина DARPin-LoPE, меченного флуоресцентным красителем DyLight650 (DARPin-LoPE-DyLight650), в сфероиды SKOV-3. **А**, Конфокальная микроскопия сфероидов SKOV-3 в отсутствие DARPin-LoPE-DyLight650. Размер изображений 708×708 мкм.

**Б**, Конфокальная микроскопия сфероидов SKOV-3 через 24 часа инкубации в присутствии DARPin-LoPE-DyLight650. Представлены изображения в проходящем свете и в канале регистрации флуоресценции DyLight650 (λех 633 нм, λет 653-730 нм). Размер изображений 708×708 мкм.

**В**, Профиль флуоресцентного сигнала в канале DyLight650 вдоль линии, указанной на изображении Б

Интересно, что противоопухолевый пептид d-пенетратин (Mr 2.2 кДа) не проникал в сфероиды SKOV-3 глубже чем на 50 мкм [260]. Графеновые наноленты длиной до 500 нм и толщиной 12-20 нм проникали на всю глубину сфероида из клеток линии SKOV-3 [261]. В экспериментальной опухоли молочной железы человека Всар37 было показано, что полимерные наночастицы размером 30 нм равномерно проникали на глубину до 100 мкм от сосуда, в то время как глубина проникновения частиц размером 100 нм не превышала 40 мкм [262,263]. Также на опухоли молочной железы было показано проникновение полимерных мицелл размером 25 нм на глубину лишь 40 мкм от сосуда, в то время как частицы размером 60-нм диффундировали лишь на 20 мкм от сосуда, а функционализация таких частиц адресной молекулой приводила к дополнительному снижению проникновения в силу возникновения «барьера связывания», упомянутого выше [264].

Такие различия могут быть обусловлены разнообразием факторов, влияющих на проникновение агента в толщу опухолевой ткани при системном введении, среди которых как особенности биологии опухоли (плотность межклеточных контактов, степень васкуляризации, жесткость внеклеточного матрикса и пр.), так и физикохимические свойства агента (размер, поверхностный заряд, функционализация поверхности). Для низкомолекулярных противоопухолевых агентов, таких как доксорубицин, глубина проникновения в большей степени обусловлена их химическими свойствами и также сильно варьирует, однако преимущественно не превышает 100 мкм от сосуда [265,266].

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что выявленное снижение чувствительности сфероидов SKOV-3-kat к действию DARPin-LoPE по сравнению с монослойной культурой, может быть обусловлено его плохим проникновением в глубь сфероида, что связано с высокой молекулярной массой данного агента.

# 3.4. Анализ участия рецептора HER2 в формировании устойчивости опухолевых клеток в трехмерной структуре

Гиперэкспрессия рецептора-онкомаркера HER2 ассоциирована со злокачественным фенотипом клеток, ускоренной пролиферацией, склонностью опухолей к инвазии и метастазированию. В то же время HER2 является наиболее изученной и успешно апробированной мишенью для таргетной терапии солидных опухолей [267]. Среди причин возникновения устойчивости к HER2-специфичному таргетному токсину DARPin-LoPE могут быть потеря или модификация его мишени, рецептора-онкомаркера HER2. Повышение устойчивости клеток опухоли к таргетным агентам, нацеленным на HER2, может быть обусловлено снижением его экспрессии в процессе адаптации клеток к таргетной терапии [268] или изменением его конфигурации, в частности, потерей им внеклеточного домена, к которому

специфичны противоопухолевые агенты, с сохранением сигнальной киназной функции [269].

Исследование уровня представленности HER2 в клетках аденокарциномы яичника выявило, что при переходе от монослойной культуры к трехмерному культивированию он возрастает (рис. 14). Это свидетельствует о том, что повышение устойчивости сфероидов к таргетному токсину DARPin-LoPE не может быть напрямую связано с уровнем представленности его мишени.

В литературе даже имеются сведения о возрастании чувствительности к таргетным агентам при переходе к трехмерному культивированию, связанном с возрастанием представленности HER2. Причиной такого эффекта может являться, в частности, его гомодимеризация, обеспечивающая более эффективное связывание с противоопухолевым агентом (трастузумабом) [270], или снижение способности к активации этого рецептора в условиях трехмерной ткани [271].



**Рис. 14**. Уровень представленности рецептора-онкомаркера HER2 в клетках SKOV-3 и SKOV-3.ip, культивируемых в монослойной культуре и сфероидах.

**А**, Распределение клеток SKOV-3 и клеток SKOV-3.ip в соответствии с интенсивностью флуоресценции после окрашивания антителами, специфичными к HER2. Красный – монослойная культура, зеленый – сфероиды на 6-й день роста; синий – сфероиды на 9-й день роста.

**Б**, Уровни представленности HER2 в монослойной культуре и сфероидах. \* – значимое отличие от монослойной культуры (ANOVA, тест множественных сравнений Холма-Сидака, р <0,05)

Следует, однако, отметить, что формирование устойчивости к таргетной терапии возможно и за счет модификации сигнальных функций HER2. В частности, за счет конститутивной активации PI3k вследствие мутации или потери PTEN<sup>66</sup> [272,273], образования высокоактивных димеров с HER3 [274], димеров с другими рецепторами факторов роста, например IGF-IR<sup>67</sup> [275]. Кроме того, устойчивость может быть обусловлена включением альтернативных путей EGFR-сигнализации, например, димеризации рецепторов HER1 и HER3 [276], сдвига в сторону большего участия иных рецепторов в регуляции жизненно важных процессов, например, c-Met<sup>68</sup> [278]. рецептора эстрогена [277], Повышение устойчивости к химиотерапевтическим агентам также может быть обусловлено сигнальными HER2. Для доксорубицина формирование устойчивости функциями может происходить путем образования популяции стволовых опухолевых клеток за счет активирования маркеров SOX2<sup>69</sup>, Oct4<sup>70</sup>, Nanog<sup>71</sup> по пути, зависимому от NFкB, что было показано для клеток карциномы яичника [279]. Ещё один механизм связан с активацией систем детоксикации при активации транскрипционного фактора  $NRF2^{72}$ , происходящей в результате его прямого взаимодействия с HER2, что было показано для карциномы молочной железы [280].

#### 3.5. Профиль экспрессии белков контактов в моделях опухолевого роста *in vitro*

Формирование устойчивости опухолевых клеток к терапевтическому воздействию в условиях трехмерной организации может определяться

 $<sup>^{66}</sup>$  PTEN – от англ. phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 – фосфатаза, ингибитор сигнального пути PI3K/AKT/mTOR

<sup>&</sup>lt;sup>67</sup> IGF-IR – от англ. insulin-like growth factor 1 – трансмембранная тирозинкиназа, рецептор инсулиноподобного фактора роста

<sup>&</sup>lt;sup>68</sup> с-Met – от англ. cellular mesenchymal-epithelial transition factor – трансмембранная тирозинкиназа, рецептор фактора роста гепатоцитов (альтернативное название HGFR, аббревиатура от hepatocyte growth factor receptor)

<sup>&</sup>lt;sup>69</sup> SOX2 – от англ. sex determining region Y)-box 2 – фактор транскрипции, необходимый для поддержания самообновления и плюрипотентности недифференцированных эмбриональных стволовых клеток.

<sup>&</sup>lt;sup>70</sup> Oct4 – от англ. octamer-binding transcription factor 4 – транскрипционный фактор участвующий в самообновлении недифференцированных эмбриональных стволовых клеток

<sup>&</sup>lt;sup>71</sup> Nanog – транскрипционный фактор, участвующий в самообновлении недифференцированных эмбриональных стволовых клеток

<sup>&</sup>lt;sup>72</sup> NRF2 – от англ. nuclear factor erythroid 2-related factor 2 – транскрипционный фактор, регулирующий экспрессию антиоксидантных белков

особенностями их микроокружения, в частности обилием межклеточных контактов и контактов с внеклеточным матриксом. С одной стороны, это может создавать стерические затруднения для прохождения противоопухолевых агентов в глубину ткани, таким образом, терапевтический агент становится малодоступен для глубоко залегающих клеток. С другой стороны, белки межклеточных контактов являются важнейшими сигнальными молекулами, слаженная работа которых во многом обеспечивает нормальный фенотип ткани [281]. Накапливаются сведения о роли взаимодействий опухолевых клеток друг с другом, клетками стромы и внеклеточным матриксом, в частности, о роли отдельных белков адгезии в формировании опухолевого фенотипа, а также сведения о том, что в клетке происходит взаимосвязанная регуляция формирования различных типов контактов, реализуемая преимущественно через адаптерные белки [6]. Это позволяет предположить, что именно комплексный анализ коллективного вклада белков межклеточных контактов всех типов является наиболее информативным подходом при исследовании их участия в развитии опухоли и её резистентности.

Нами была исследована представленность интегральных белков межклеточных контактов различных типов: адгезивных (Е-кадгерина), плотных (окклюдина и адаптерного белка ZO-1), щелевых (коннексина-43) и десмосом (десмоглеина-2). Данный анализ проводился на клетках аденокарциномы яичника человека линий SKOV-3 и SKOV-3.ip при их культивировании в виде монослойной культуры и сфероидов различного возраста (6 и 9 суток). Для данных линий установлены различия в метастатическом потенциале и устойчивости к терапевтическим воздействиям: линия SKOV-3.ip, получена путем интраперитонеальной инъекции клеток линии SKOV-3 иммунодефицитным мышам с последующим сбором клеток из асцита, более агрессивна и отличается более высоким уровнем экспрессии HER2 [224].

Следует отметить, что клетки данных линий, культивируемые в виде монослойной культуры, имеют морфологию, сходную с таковой у фибробластов:

веретеновидная форма, наличие отростков (рис. 15). Сфероиды из клеток двух исследованных линий имели различную морфологию и ростовые характеристики: сфероиды обеих линий представляли собой рыхлые клеточные конгломераты, в то же время сфероиды на основе линии SKOV-3.ip формировались дольше (4 суток против 3-х для линии SKOV-3), росли быстрее (имели больший размер, чем сфероиды SKOV-3 на одинаковые сутки роста) и имели тенденцию к формированию облака из слабо прикрепленных клеток по периферии сфероида (рис. 15).

Было показано, что белок адгезивных контактов Е-кадгерин отсутствовал как в монослойной культуре, так и в сфероидах из обеих исследуемых клеточных линий (рис. 16 А, Б). Е-кадгерин является признанным эпителиальным маркером и его потеря является одним из важных критериев запуска ЭМП [38]. Наблюдаемое отсутствие адгезивных контактов на основе Е-кадгерина согласуется с мезенхимальной морфологией клеток исследуемых линий и особенностями структуры полученных из них сфероидов (рис. 15).



Монослойная культура Сфероиды (6 день роста) Сфероиды (9 день роста)

**Рис. 15.** Морфология клеток линий SKOV-3 и SKOV-ір и сфероидов, полученных из клеток этих линий на 6 и 9 день роста. Линейка – 100 мкм

Данные о содержании Е-кадгерина в клетках рака яичника, представленные в литературе, противоречивы. Значительное количество работ указывает на то, что уровень Е-кадгерина низкий и снижается по мере развития опухоли, например, при метастазировании [282-284]. Это наблюдение в основном согласуется с нашими результатами, поскольку клеточные линии SKOV-3 и SKOV-3.ip были получены из асцита, характерного для запущенных опухолей. В то же время, как сообщается в работе [285], содержание Е-кадгерина в клеточной линии SKOV-3.ip более выражено, чем в SKOV-3, несмотря на более высокий метастатический потенциал и агрессивный фенотип SKOV-3.ip . Такая же тенденция наблюдалась и в нашем исследовании (рис. 16, Б), однако она была слабо выражена. В ряде работ сообщается о повышенном уровне Е-кадгерина в опухолевых сфероидах по сравнению с монослоем [144,286,287], что может способствовать, в частности, повышению резистентности сфероидов рака яичника к цисплатину [288].

Для белка десмосом десмоглеина-2 был также показан в целом невысокий уровень представленности и показана тенденция его к снижению в сфероидах по сравнению с монослойной культурой, усиливавшаяся с возрастом сфероидов (рис. 16 В, Г), однако выявленные отличия не являются достоверными. Стоит отметить, что в линии SKOV-3.ip представленность десмоглеина-2 была статистически значимо выше, чем в линии SKOV-3, независимо от условий культивирования. К настоящему времени опубликовано большое число работ, показывающих, что снижение экспрессии десмоглеина-2 сопряжено с усилением метастатического потенциала и агрессивности опухолевых клеток [58,167]. В то же время необходимо отметить, что повышение кспрессии демоглеин-2 в клетке также может приводить к более злокачественному фенотипу [289,290]. Зарегистрированные нами отличия в морфологии сфероидов, полученных из двух линий клеток, могут быть связаны, среди прочих факторов, с более высокой представленностью десмоглеина-2 в клетках SKOV-3.ip. Механизм такого влияния требует дальнейшего изучения.



**Рис.** 16. Уровень представленности белков адгезивных контактов (Е-кадгерина), десмосом (десмоглеина-2) и щелевых контактов (коннексина-43) в клетках SKOV-3 и SKOV-3.ip, культивируемых в монослойной культуре и сфероидах.

А, В, Д, Распределение клеток SKOV-3 и клеток SKOV-3.ip в соответствии с интенсивностью флуоресценции после окрашивания антителами, специфичными к Е-кадгерину (А), десмоглеину-2 (В) и коннексину-43 (Д). Красный – монослойная культура, зеленый – сфероиды на 6-й день роста; синий – сфероиды на 9-й день роста.

**Б**, **Г**, **Е**, Уровень относительной флуоресценции Е-кадгерина (Б), десмоглеина-2 (Г) и коннексина-43 (Е) в монослойной культуре и сфероидах. \* – значимое отличие от монослойной культуры (ANOVA, тест множественных сравнений Холма-Сидака, р <0,05); *‡* - значимое различие уровня представленности десмоглеина-2 в исследуемых линиях клеток (t-критерий с поправкой Велча, р < 0,05)

Белок щелевых контактов коннексин-43 был наиболее представленным в клетках обеих клеточных линий (рис. 16 Д, Е). Было показано статистически значимое снижение его представленности в сфероидах по сравнению с монослойной культурой, более чем в 2 раза. Щелевые контакты и, в частности, коннексин-43, ответственны за поддержание нормального фенотипа ткани за счет сохранения поляризации клеток [62], подавления ангиогенеза вследствие ингибирования образования трубок эндотелиальными клетками [291], подавления VEGF<sup>73</sup> [292] или участия в иммунном синапсе [293,294]. Потеря экспрессии коннексина-43 сопровождается прогрессированием опухоли. Это может быть опосредовано через сигнальный Wnt, активация была путь которого показана ДЛЯ клеток колоректального рака HT29 [295] и клеток немалигнизированного эпителия молочной железы HMT-3522 S1 [296]. Потеря коннексина-43 также может привести к злокачественной трансформации, о которой сообщалось для доброкачественных опухолей щитовидной железы [297].

Исследование представленности белков плотных контактов показало, что в клетках обеих линий содержание окклюдина находится на среднем уровне, в сфероидах оно статистически значимо падает. Представленность ZO-1 была относительно низкой, различия между клетками, культивируемыми в разных условиях, были выявлены только для 9-дневных сфероидов SKOV-3.ip (рис. 17). Обнаруженное снижение представленности окклюдина не согласуется с большинством опубликованных работ о сфероидах. В частности, в ряде работ показано, что при формировании сфероидов из клеток аденокарциномы легкого и гепатоцеллюлярной карциномы уровень окклюдина повышался [298,299]. В то же время снижение уровня окклюдина, аналогично зарегистрированному в нашей работе, было продемонстрировано при образовании сфероидов аденокарциномы молочной железы; авторами предполагается, что отсутствие плотных контактов облегчало поступление трофических факторов к опухолевым клеткам по парацеллюлярному пути, таким

<sup>&</sup>lt;sup>73</sup> VEGF - от англ. vascular endothelial growth factor - эндотелиальный фактор роста сосудов

образом препятствуя формированию некротического ядра и способствуя агрессивному поведению опухоли [300].



**Рис.** 17. Уровень представленности белков плотных контактов (окклюдина и ZO-1) в клетках SKOV-3 и SKOV-3.ip, культивируемых в монослойной культуре и сфероидах.

**А, В,** Распределение клеток SKOV-3 и клеток SKOV-3.ip в соответствии с интенсивностью флуоресценции после окрашивания антителами, специфичными к окклюдину (А) и ZO-1 (В). Красный – монослойная культура, зеленый – сфероиды на 6-й день роста; синий – сфероиды на 9-й день роста.

**Б**, **Г**, Уровень относительной флуоресценции окклюдина (Б) и ZO-1 (Г) в монослойной культуре и сфероидах. \* – значимое отличие от монослойной культуры (ANOVA, тест множественных сравнений Холма-Сидака, р <0,05)

Для ZO-1 широко показано его участие в супрессии опухолей [301], а его потеря коррелирует с развитием колоректального рака [302] и усилением метастазирования [303]. В то же время важно учитывать не только уровень экспрессии ZO-1, но и его локализацию в клетке, так как показано, что его ядерная локализация способствует усиленной выработке воспалительных цитокинов, что

ведет к привлечению в опухоль иммуносупрессорных клеток, таким образом, способствуя развитию опухоли [304].

Таким образом, в условиях *in vitro* было выявлено снижение представленности белков межклеточных контактов в трехмерных моделях опухоли по сравнению с монослойной культурой (рис. 15, 16). По литературным данным снижение представленности белков межклеточных контактов в целом свидетельствует о приобретении клетками мезенхимального фенотипа [2]. Такое снижение количества белков контактов согласуется, в частности, с рыхлым характером формируемых сфероидов. Наиболее принципиальное отличие между двумя линиями клеток, SKOV-3 и SKOV-3.ip показано в отношении уровня экспрессии десмоглеина-2. Отметим также, что принципиального отличия между сфероидами разного возраста выявлено не было [305]

Следует также упомянуть, что агрессивность опухолевых клеток И приобретением ими устойчивости к лечению могут быть сопряжены не только с подавлением синтеза тех или иных белков межклеточных контактов, но и с неправильной локализацией этих белков в клетке [163,297]. Наибольшее количество таких случаев, из исследованных в работе белков, было описано для белка щелевых контактов коннексина-43 [295,297]. Внутриклеточная локализация коннексина-43 часто обусловлена нарушением его транспорта из-за дефектов самого белка [306], процесса его транспорта дефектов белков-участников [307,308], дефицита стабилизирующих адаптерных белков [309], или нарушения процесса деградации [310]. Перемещение коннексина-43 во внутриклеточное пространство, как правило, приводит к усилению злокачественного потенциала опухоли, с одной стороны, за счет потери интегрирующей функции щелевых контактов, а с другой – за счет выполнения им нетипичных функций. Например, коннексин-43 может выступать прямым активатором транскрипции мезенхимального маркера N-кадгерина [308], запускать синтез факторов стволовости Oct4 и Nanog [307].

В ходе исследования локализации коннексина-43 в клетках аденокарциномы яичника человека линий SKOV-3 и SKOV-3.ip было обнаружено, что на фоне высокой общей представленности в обеих исследованных линиях, не более 20% от общего количества было представлено на поверхности клетки. При этом общая представленность коннексина-43 была выше клетках линии SKOV-3 по сравнению с линией SKOV-3.ip (рис. 18). Превосходящая общая представленность коннексина-43 в клетках линии SKOV-3 в целом согласуется с ее менее агрессивным фенотипом. В то же время факт «неправильной» локализации коннексина-43 в исследуемых линиях может свидетельствовать об их в целом высокой агрессивности. Так, для линии SKOV-3 были описаны стволовые черты, в частности, высокая активность BMI1<sup>74</sup>, Nanog и SOX2 [311], для линии SKOV-3.ip – высокая активность CD133 [312].



Рис. 18. Уровень общей представленности и представленности поверхностно расположенного коннексина-43 в клетках линий SKOV-3 и SKOV-3.ip. \* – значимое отличие между общим и поверхностно расположенным белком (непарный t-критерий с поправкой Велча, p<0,05)

# 3.6. Профиль экспрессии белков контактов в экспериментальных опухолях *in vivo*

Несмотря на значительный прогресс в области создания трехмерных моделей *in vitro* для изучения биологии опухолей и тестирования с их помощью новых лекарственных средств, вопрос их сопоставимости с условиями *in vivo* остается открытым. Для анализа представленности белков контактов в опухолях *in vivo* были

<sup>&</sup>lt;sup>74</sup> ВМІ1 – от англ. В lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog – транскрипционный фактор, онкоген, регулятор ингибиторов клеточного цикла

ксенографтные опухоли В иммунодефицитных получены мышах двух В локализациях – подкожной и интраперитонеальной. Ранее было показано, что обе модели показывают высокую степень схожести с оригинальной опухолью пациента как с точки зрения молекулярного, так и метаболического профиля [313,314]. Выбор двух локализаций был обусловлен тем, что подкожная ксенографтная модель классической является для моделирования опухолей эпителиального происхождения, в то время как интраперитонеальная модель представляется более релевантной для опухолей яичника, так как имитирует характерное для данного типа опухолей множественное метастазирование по брюшной полости [315]. Следует также отметить, что модели предполагают различные данные условия микроокружения для прививаемых клеток и потенциально могут задавать образование ксенографтных опухолей различной морфологии. Так, в условиях прививки подкожной опухоли наблюдается плотная упаковка соседствующих эпителиальных клеток и присутствие большого количества белков внеклеточного матрикса [316]. В случае же прививки интраперитонеальной опухоли клеткине ограничены условиями ткани и омываются интраперитонеальной жидкостью, богатой иммунными клетками [317].

Полученные подкожные опухоли представляли плотные, четко локализованные узлы. Интраперитонеальные узлы были диссеминированы по брюшной полости и были в основном локализованы на брыжейке, в сальнике, в складках долей печени и на селезенке (рис. 19). Клетки линии SKOV-3.ip (>100) мелких узлов, формировали множество рассеянных брыжейке, ПО объединявшихся в гроздевидные скопления в складках печени и сальника (0,5 – 1,5 мм в диаметре) и до 3х крупных узлов (до 5 мм в диаметре), в то время как опухоли на основе клеток SKOV-3 преимущественно не превышали 3 мм в диаметре, а их количество не превышало 7-8 шт. Превосходящая по объему опухолевая масса из клеток линии SKOV-3.ip по сравнению с линией SKOV-3, формирующаяся за сопоставимое время, говорит о более высокой скорости роста опухоли на основе

клеток этой линии, что согласуется с литературными данными о ее более высокой агрессивности [224].



Рис. 19. Типичный внешний вид полученных экспериментальных опухолей. Стрелками обозначены опухолевые узлы.

А, Подкожно привитая опухоль: единичный узел, сформированный в месте прививки клеток.

**Б**, Интраперитонеально привитая опухоль: множественные опухолевые узлы, прикрепленные к брыжейке

Спектр рассматриваемых белков в данных моделях был дополнен. Был дополнительно исследован уровень представленности мезенхимального маркера виментина, белка промежуточных филаментов, и, для учета взаимодействий клеткаматрикс была проанализирована представленность интегрина β1, одного из самых распространенных интегриновых белков, участвующего в форме димеров с альфаинтегринами в рецепции различных компонентов матрикса. Уровни представленности белков интереса сравнивали для полученных ксенографтных опухолей и сфероидов.

Представленность белков межклеточных контактов Е-кадгерина, десмоглеина-2 и коннексина-43 была сопоставима в сфероидах и в ксенографтных моделях обеих локализаций (рис. 20 А, Б, Г). Для окклюдина наблюдались колебания уровня его в целом низкой представленности (рис. 20 В). Низкую представленность окклюдина как правило связывают с потерей тканевой целостности и склонностью клеток к миграции [151,318].



**Рис. 20**. Уровень представленности белков контактов клетка-клетка, клетка-матрикс и белка промежуточных фиаментов виментина в клетках SKOV-3 и SKOV-3.ip, выращенных в виде сфероидов и полученных из подкожно и интраперитонеально привитых ксенографтных моделей опухоли. Красный – сфероиды на 6 день роста, зеленый – клетки подкожно привитой опухоли; синий – клетки интраперитонеально привитой опухоли. \* – значимое отличие от сфероидов (ANOVA, тест множественных сравнений Холма-Сидака, р <0,05).

**А-Г**, Уровень представленности белков контактов клетка-клетка: Е-кадгерина, десмоглеина-2, окклюдина и коннексина-43.

Д, Уровень представленности белка контактов клетка-матрикс интегрина β1.

Е, Уровень представленности белка промежуточных филаментов виментина

Было выявлено, что представленность интегрина β1 высока в сфероидах на основе обеих исследованных линий. В то же время в опухолях на основе линии SKOV-3 представленность интегрина β1 была существенно ниже таковой в сфероидах. Для линии SKOV-3.ip отличий между моделями выявлено не было (рис. 20 Д). Имеются сведения, что потеря экспрессии интегрина β1 в случае инвазивного рака молочной железы ассоциируется со значительным снижением выживаемости пациентов [319].

Белок промежуточных филаметов виментин, являющийся признанным маркером мезенхимальности, был представлен в сфероидах обеих исследованных клеточных линий на сравнительно низком уровне, однако в условиях ксенографтных опухолей *in vivo* было отмечено статистически значимое повышение его представленности, особенно выраженное для линии SKOV-3.ip (рис. 20 Е), что согласуется с описанным для нее более агрессивным фенотипом. Повышение экспрессии виментина может запускаться в ходе эпителиально-мезенхимального перехода по β-катенин/Wnt пути [320]. Отмечено, что высокая экспрессия виментина характерна для 3D-условий ткани ввиду большого давления скученных клеток, где виментин выступает в роли клеточного каркаса, а в ходе миграции, благодаря своим вязкостно-эластическим свойствам, он защищает ядро при сильных деформациях клетки, возникающих в ходе ее движения в условиях тканевых ограничений [321].

Одновременная более высокая представленность интегрина β1 и виментина в опухолях из клеток линии SKOV-3.ip по сравнению с линией SKOV-3, может являться фактором, объясняющим различия в агрессивности этих клеточных линий. Возможно, такая комбинация обусловливает более высокую подвижность клеток за счет участия фокальных контактов в движении, и успешность их миграции в условиях ткани. Это предположение, однако, требует экспериментальной проверки.

Резюмирующий профиль рассмотренных белков межклеточных контактов представлен на рисунке 21.



**Рис. 21.** Резюмирующий профиль представленности белков адгезии в сфероидах и моделях опухоли *in vivo*. ПКО – подкожная опухоль, ИПО – интраперитонеальная опухоль. **А,** Модели на основе линии SKOV-3.

**Б**, Модели на основе линии SKOV-3.ip

Сфероиды в целом отражают состояние межклеточной адгезии в опухолях in *vivo*, а именно, невысокий уровень представленности белков адгезивных, плотных контактов и десмосом, и высокую представленность щелевых контактов. В то же время, низкий уровень представленности виментина в клетках сфероидов не соответствует таковому в ткани *in vivo*. Аналогичная ситуация с более выраженной мезенхимальностью клеток опухолевой модели *in vivo* по сравнению со сфероидами *in vitro* была продемонстрирована для карциномы молочной железы по данным транскриптомного анализа [322]. Следует отметить, ДЛЯ сфероидов что аденокарциномы созданных основе яичника, так же на монокультуры, транскриптомный анализ показал формирование популяций клеток, способных к самообновлению, причем усиление экспрессии генов, ассоциированных с ЭМП было связано именно с тем, что клетки культивировались в виде трехмерной структуры [323]. Развитие таких характеристик может объяснять возрастающую устойчивость опухолевых клеток к терапевтическому воздействию. Однако, в целом несмотря на значительное сходство сфероидов с моделью *in vivo*, отличия в представленности отдельных белков не позволяют утверждать, что сфероиды можно признать идеальной моделью опухолевого роста в контексте анализа ее микроокружения.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время развивается точка зрения, согласно которой формирование устойчивости опухолей лекарственной связано с особенностями сложной трехмерной организации опухолевой ткани. Наряду с проблемами «логистики» терапевтических агентов и сохранения их функциональности в условиях опухоли все более пристальное внимание уделяется кооперации клеток опухолевой паренхимы и стромы для противостояния токсическому воздействию. Ярким примером такой кооперации может служить препятствие локальному достижению терапевтически значимой дозы вещества, обеспечивающего гибель клетки, путем его распределения через щелевые контакты, что показано при химиотерапии непосредственно для химиотерапевтического агента [324], для кальция, необходимого для запуска апоптоза [325], а также для активных форм кислорода [326].

В данной работе было продемонстрировано, что при переходе к трехмерному культивированию в виде сфероидов клетки аденокарциномы яичника формируют устойчивость к терапевтическим агентам различной природы. Среди возможных причин формирования устойчивости по отношению к высокомолекулярному HER2специфичному таргетному токсину DARPin-LoPE было показано его ограниченное проникновение в глубь сфероида. Причиной плохого проникновения могли стать как высокая молекулярная масса агента, так и характерное для высокоаффинных агентов чрезмерно стабильное связывание с мишенями в поверхностных слоях опухоли аналогичный [257]. белок, обладающий Ввиду того, ЧТО ПО массе не специфичностью к HER2, имел сопоставимую глубину проникновения, можно сделать вывод, что именно высокая молекулярная масса агента препятствует его проникновению в сфероид. Фактором устойчивости к таргетному агенту может также служить потеря опухолевыми клетками мишени данного агента. Однако продемонстрированное повышение представленности рецептора HER2 при переходе к трехмерному культивированию не позволяет рассматривать это изменение как прямой фактор формирования устойчивости к DARPin-LoPE. Альтернативный

механизм устойчивости к таргетной терапии при сохранении уровня представленности HER2 может заключаться в изменении нижележащих участников сигнального каскада по пути PI3k/Akt/mTOR [327].

В исследования участия белков межклеточных рамках контактов В возникновении лекарственной устойчивости было продемонстрировано снижение представленности белков большинства типов межклеточных контактов в клетках, формирование трехмерной белков сопровождающее структуры. Потеря свидетельствует о приобретении межклеточных контактов более клетками мезенхимального фенотипа. Аналогичное снижение представленности белков межклеточных контактов (Е-кадгерина, ZO-1 и окклюдина) было показано при формировании сфероидов из клеток карциномы щитовидной железы (линия FRO) с одновременным повышением представленности интегрина β1, что сопровождалось более высокой подвижностью клеток и усиливавшимся мезенхимальным фенотипом [286]. В нашей работе продемонстрирована высокая представленность интегрина β1 как в сфероидах, так и в ксенографтных моделях опухоли *in vivo* на фоне низкой представленности белков межклеточных контактов. В опубликованных раннее работах других научных групп также упоминалось, что формирование сфероидов из клеток аденокарциномы яичника осуществляется преимущественно за счет интегрина β1, и клетки, выращенные в виде сфероидов, обладают более высокой инвазивностью [328,329]. Это позволяет сделать предположение о том, что снижение межклеточной адгезии и повышение представленности интегрина  $\beta 1$  могут рассматриваться фактор развития более как клетками злокачественного мезенхимального фенотипа и таким образом вносить вклад в возникающую устойчивость к терапевтическим агентам.

Большое количество исследований показывает связь между изменениями представленности транскрипционных факторов, регулирующих эпителиально-

мезенхимальный переход (Snail/Slug, ZEB1,2, TWIST<sup>75</sup>, YAP/TAZ) в формировании устойчивости как к классическим химиотерапевтическим, так и к таргетным агентам [330-332]. Потеря опухолевой клеткой белков всех типов контактов может вести к приобретению ею также стволового фенотипа [333]. Устойчивость стволовых опухолевых клеток значительно превосходит таковую у обычных опухолевых клеток и может реализовываться за счет их возможности к самообновлению, перехода в устойчивости, покоящееся состояние, усиления классических механизмов характерных на уровне клетки [334]. При этом включение программы эпителиальномезенхимального перехода в случае опухолевых клеток обычно не реализуется в полном объеме, чаще всего клетки претерпевают переход лишь частично, подстраиваясь под условия ткани. Такая пластичность может осуществляться за счет эпигенетической регулировки и создает огромную гетерогенность клеточных популяций в опухоли. Скорее всего, именно эта способность опухолевых клеток находиться в промежуточном состоянии позволяет им успешно метастазировать, так как дает возможность быстрого перехода как в сторону более мезенхимального фенотипа (для открепления, миграции), так и в сторону эпителиального (адаптация в новом микроокружении) [335]. В литературе отмечался такой переходный фенотип для использованных в работе линий клеток [336-338].

Имеющиеся на сегодняшний день данные об участии трехмерной структуры опухоли и, в частности, об участии белков межклеточных контактов в формировании ее устойчивости к лечению, разрозненны и противоречивы. В значительной степени это обусловлено тем, что большая часть исследований акцентирует внимание на отдельных белках, и дизайн исследования строится на основе подавления или искусственной индукции экспрессии конкретного белка. Полученные нами данные о профиле представленности белков межклеточных контактов демонстрируют, что для клеток аденокарциномы яичника при формировании трехмерной структуры

<sup>&</sup>lt;sup>75</sup> TWIST – наименование белка class A basic helix–loop–helix protein 38 – белок, содержащий основной мотив «спираль-петля-спираль», класса А. Транскрипционный фактор, регулятор дифференцировки, онкоген

характерно снижение представленности белков межклеточных контактов и высокая представленность контактов клетка-матрикс. Низкая представленность белков контактов клетка-клетка в сфероидах отражает таковую в моделях опухоли *in vivo*, однако имеются существенные отличия моделей по белку контактов клетка-матрикс и мезенхимальному маркеру виментину. Эти данные в целом свидетельствуют об усилении мезенхимальности фенотипа клеток аденокарциномы яичника при формировании трехмерной структуры, тем более в условиях организма, что может являться фактором развитии устойчивости опухоли к терапевтическому воздействию.

### выводы

- переходе к трехмерному культивированию в виде 1. Показано, что при сфероидов клетки аденокарциномы яичника человека приобретают устойчивость терапевтическим К агентам различной природы: антибиотику доксорубицину цитостатическому рекомбинантному И противоопухолевому токсину DARPin-LoPE, причем таргетному ДЛЯ высокомолекулярного агента приобретаемая устойчивость более выражена.
- 2. Глубина проникновения HER2-специфичного таргетного токсина DARPin-LoPE и сопоставимого по молекулярной массе бычьего сывороточного альбумина в толщу опухолевого сфероида со сверхэкспрессией HER2 совпадает и не превышает 70 мкм. Это свидетельствует о незначительной роли «барьера связывания» при развитии устойчивости к высокомолекулярному агенту за счет ограничения его проникновения.
- 3. Представленность рецептора-онкомаркера HER2 на клетках линий аденокарциномы яичника человека SKOV-3 и SKOV-3.ip при переходе к трехмерному культивированию возрастает.
- 4. Клетки аденокарциномы яичника человека SKOV-3 и SKOV-3.ip характеризуются отсутствием экспрессии Е-кадгерина. При переходе к культивированию клеток в сфероидах происходит снижение представленности белков межклеточных контактов, в том числе белка щелевых контактов коннексина-43 и белков плотных контактов окклюдина и ZO-1 на фоне низкой представленности белка десмосом десмоглеина-2. Снижение межклеточной адгезии служит маркером эпителиально-мезенхимального перехода и может свидетельствовать о приобретении клетками более агрессивного фенотипа.
- 5. Выявлено относительное сходство сфероидов аденокарциномы яичника человека и ксенографтных опухолевых моделей по представленности Е-

кадгерина, десмоглеина-2 и коннексина-43. В то же время, для линии SKOV-3 обнаружено значимое преобладание интегрина β1 в сфероидах по сравнению с моделями *in vivo*. Для линии SKOV-3.ip обнаружено значимое преобладание виментина в моделях *in vivo* по сравнению со сфероидами и статистически значимый более низкий уровень представленности окклюдина.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- St Croix B., Kerbel R.S. Cell adhesion and drug resistance in cancer // Current opinion in oncology. – 1997. – Vol. 9. – P. 549-556. doi:10.1097/00001622-199711000-00010.
- Janiszewska M., Primi M.C., Izard T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells // The Journal of biological chemistry. – 2020. – Vol. 295. – P. 2495-2505. doi:10.1074/jbc.REV119.007759.
- Anderson N.M., Simon M.C. The tumor microenvironment // Current biology : CB. - 2020. - Vol. 30. - P. R921-R925. doi:10.1016/j.cub.2020.06.081.
- Bakir B., Chiarella A.M., Pitarresi J.R., Rustgi A.K. EMT, MET, Plasticity, and Tumor Metastasis // Trends in cell biology. – 2020. – Vol. 30. – P. 764-776. doi:10.1016/j.tcb.2020.07.003.
- Du F., Liu H., Lu Y., Zhao X., Fan D. Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Liaison between Cancer Metastasis and Drug Resistance // Critical reviews in oncogenesis. – 2017. – Vol. 22. – P. 275-282. doi:10.1615/CritRevOncog.2018024855.
- Aggarwal V., Montoya C.A., Donnenberg V.S., Sant S. Interplay between tumor microenvironment and partial EMT as the driver of tumor progression // iScience. – 2021. – Vol. 24. – P. 102113. doi:10.1016/j.isci.2021.102113.
- Rubtsova S.N., Zhitnyak I.Y., Gloushankova N.A. Phenotypic Plasticity of Cancer Cells Based on Remodeling of the Actin Cytoskeleton and Adhesive Structures // International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol. 22. – P. doi:10.3390/ijms22041821.
- Bukowski K., Kciuk M., Kontek R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol. 21. – P. doi:10.3390/ijms21093233.

- Mansoori B., Mohammadi A., Davudian S., Shirjang S., Baradaran B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review // Advanced pharmaceutical bulletin. – 2017. – Vol. 7. – P. 339-348. doi:10.15171/apb.2017.041.
- Peetla C., Vijayaraghavalu S., Labhasetwar V. Biophysics of cell membrane lipids in cancer drug resistance: Implications for drug transport and drug delivery with nanoparticles // Adv Drug Deliv Rev. – 2013. – Vol. 65. – P. 1686-1698. doi:10.1016/j.addr.2013.09.004.
- Robey R.W., Pluchino K.M., Hall M.D., Fojo A.T., Bates S.E., Gottesman M.M. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer // Nature reviews. Cancer. – 2018. – Vol. 18. – P. 452-464. doi:10.1038/s41568-018-0005-8.
- Hraběta J., Belhajová M., Šubrtová H., Merlos Rodrigo M.A., Heger Z., Eckschlager T. Drug Sequestration in Lysosomes as One of the Mechanisms of Chemoresistance of Cancer Cells and the Possibilities of Its Inhibition // International journal of molecular sciences. 2020. Vol. 21. P. doi:10.3390/ijms21124392.
- Kaur G., Gupta S.K., Singh P., Ali V., Kumar V., Verma M. Drug-metabolizing enzymes: role in drug resistance in cancer // Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico. – 2020. – Vol. 22. – P. 1667-1680. doi:10.1007/s12094-020-02325-7.
- Wang E., Shibutani M., Nagahara H., Fukuoka T., Iseki Y., Okazaki Y., Kashiwagi S., Tanaka H., Maeda K., Hirakawa K.; et al. Abundant intratumoral fibrosis prevents lymphocyte infiltration into peritoneal metastases of colorectal cancer // PloS one. 2021. Vol. 16. P. e0255049. doi:10.1371/journal.pone.0255049.
- Labani-Motlagh A., Ashja-Mahdavi M., Loskog A. The Tumor Microenvironment: A Milieu Hindering and Obstructing Antitumor Immune Responses // Frontiers in Immunology. – 2020. – Vol. 11. – P. doi:10.3389/fimmu.2020.00940.

- Kim R., Emi M., Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape // Immunology. – 2007. – Vol. 121. – P. 1-14. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x.
- Comaills V., Kabeche L., Morris R., Buisson R., Yu M., Madden M.W., LiCausi J.A., Boukhali M., Tajima K., Pan S.; et al. Genomic Instability Is Induced by Persistent Proliferation of Cells Undergoing Epithelial-to-Mesenchymal Transition // Cell reports. 2016. Vol. 17. P. 2632-2647. doi:10.1016/j.celrep.2016.11.022.
- De Las Rivas J., Brozovic A., Izraely S., Casas-Pais A., Witz I.P., Figueroa A. Cancer drug resistance induced by EMT: novel therapeutic strategies // Archives of toxicology. – 2021. – Vol. 95. – P. 2279-2297. doi:10.1007/s00204-021-03063-7.
- Basics of Cell Signaling. In *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*;
   2014; pp. 1-26.
- Chapter 6 Cell Adhesion and the Extracellular Matrix. In *Medical Cell Biology* (*Third Edition*), Goodman, S.R., Ed.; Academic Press: San Diego, 2008; pp. 191-225.
- Perez-Moreno M., Jamora C., Fuchs E. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions // Cell. 2003. Vol. 112. P. 535-548. doi:10.1016/s0092-8674(03)00108-9.
- Nguyen N.M., Pulkkinen L., Schlueter J.A., Meneguzzi G., Uitto J., Senior R.M. Lung development in laminin γ2 deficiency: abnormal tracheal hemidesmosomes with normal branching morphogenesis and epithelial differentiation // Respiratory Research. – 2006. – Vol. 7. – P. 28. doi:10.1186/1465-9921-7-28.
- Medalia O., Geiger B. Frontiers of microscopy-based research into cell-matrix adhesions // Current Opinion in Cell Biology. – 2010. – Vol. 22. – P. 659-668. doi:https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.08.006.
- Peracchia C., Leverone Peracchia L.M. Calmodulin-Connexin Partnership in Gap Junction Channel Regulation-Calmodulin-Cork Gating Model // International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol. 22. – P. 13055.

- Takeichi M. Self-organization of animal tissues: cadherin-mediated processes // Developmental cell. – 2011. – Vol. 21. – P. 24-26. doi:10.1016/j.devcel.2011.06.002.
- 26. Leckband D., Sivasankar S. Biophysics of cadherin adhesion // Sub-cellular biochemistry. 2012. Vol. 60. P. 63-88. doi:10.1007/978-94-007-4186-7\_4.
- 27. Gumbiner B.M. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis // Nature reviews. Molecular cell biology. – 2005. – Vol. 6. – P. 622-634. doi:10.1038/nrm1699.
- Garrod D.R., Merritt A.J., Nie Z. Desmosomal cadherins // Current Opinion in Cell Biology. – 2002. – Vol. 14. – P. 537-545. doi:https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00366-6.
- Posy S., Shapiro L., Honig B. Sequence and structural determinants of strand swapping in cadherin domains: do all cadherins bind through the same adhesive interface? // Journal of molecular biology. – 2008. – Vol. 378. – P. 954-968. doi:10.1016/j.jmb.2008.02.063.
- Shapiro L., Weis W.I. Structure and biochemistry of cadherins and catenins // Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2009. – Vol. 1. – P. a003053. doi:10.1101/cshperspect.a003053.
- Nollet F., Kools P., van Roy F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members // Journal of molecular biology. – 2000. – Vol. 299. – P. 551-572. doi:10.1006/jmbi.2000.3777.
- Pokutta S., Herrenknecht K., Kemler R., Engel J. Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding // European journal of biochemistry. – 1994. – Vol. 223. – P. 1019-1026. doi:10.1111/j.1432-1033.1994.tb19080.x.
- Boggon T.J., Murray J., Chappuis-Flament S., Wong E., Gumbiner B.M., Shapiro L.
   C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms //

Science (New York, N.Y.). – 2002. – Vol. 296. – P. 1308-1313. doi:10.1126/science.1071559.

- Lien W.H., Klezovitch O., Vasioukhin V. Cadherin-catenin proteins in vertebrate development // Curr Opin Cell Biol. – 2006. – Vol. 18. – P. 499-506. doi:10.1016/j.ceb.2006.07.001.
- 35. Sturtzel C. Endothelial Cells // Advances in experimental medicine and biology. –
  2017. Vol. 1003. P. 71-91. doi:10.1007/978-3-319-57613-8\_4.
- Ferreira A.R., Felgueiras J., Fardilha M. Signaling pathways in anchoring junctions of epithelial cells: cell-to-cell and cell-to-extracellular matrix interactions // Journal of receptor and signal transduction research. – 2015. – Vol. 35. – P. 67-75. doi:10.3109/10799893.2014.931426.
- 37. Fichtner D., Lorenz B., Engin S., Deichmann C., Oelkers M., Janshoff A., Menke A., Wedlich D., Franz C.M. Covalent and density-controlled surface immobilization of E-cadherin for adhesion force spectroscopy // PloS one. 2014. Vol. 9. P. e93123. doi:10.1371/journal.pone.0093123.
- 38. Loh C.-Y., Chai J.Y., Tang T.F., Wong W.F., Sethi G., Shanmugam M.K., Chong P.P., Looi C.Y. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges // Cells. – 2019. – Vol. 8. – P. 1118.
- 39. Komiya Y., Habas R. Wnt signal transduction pathways // Organogenesis. 2008. –
  Vol. 4. P. 68-75. doi:10.4161/org.4.2.5851.
- 40. McCrea P.D., Gu D. The catenin family at a glance // Journal of cell science. 2010.
   Vol. 123. P. 637-642. doi:10.1242/jcs.039842.
- Hernández-Martínez R., Ramkumar N., Anderson K.V. p120-catenin regulates WNT signaling and EMT in the mouse embryo // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2019. Vol. 116. P. 16872-16881. doi:10.1073/pnas.1902843116.

- 42. Etienne-Manneville S. Adherens junctions during cell migration // Sub-cellular biochemistry. 2012. Vol. 60. P. 225-249. doi:10.1007/978-94-007-4186-7\_10.
- 43. Gupta S., Yap A.S. How adherens junctions move cells during collective migration // Faculty reviews. – 2021. – Vol. 10. – P. 56. doi:10.12703/r/10-56.
- 44. Venugopal S., Anwer S., Szászi K. Claudin-2: Roles beyond Permeability Functions
  // International journal of molecular sciences. 2019. Vol. 20. P. 5655.
- Citi S., Sabanay H., Kendrick-Jones J., Geiger B. Cingulin: characterization and localization // Journal of cell science. – 1989. – Vol. 93 (Pt 1). – P. 107-122. doi:10.1242/jcs.93.1.107.
- 46. Soini Y. Claudins in lung diseases // Respiratory Research. 2011. Vol. 12. P. 70. doi:10.1186/1465-9921-12-70.
- 47. Díaz-Coránguez M., Liu X., Antonetti D.A. Tight Junctions in Cell Proliferation // International journal of molecular sciences. – 2019. – Vol. 20. – P. doi:10.3390/ijms20235972.
- 48. Fan J., Tatum R., Hoggard J., Chen Y.-H. Claudin-7 Modulates Cl– and Na+ Homeostasis and WNK4 Expression in Renal Collecting Duct Cells // International journal of molecular sciences. – 2019. – Vol. 20. – P. 3798.
- Milatz S. A Novel Claudinopathy Based on Claudin-10 Mutations // International journal of molecular sciences. – 2019. – Vol. 20. – P. 5396.
- Schlingmann B., Molina S.A., Koval M. Claudins: Gatekeepers of lung epithelial function // Seminars in Cell & Developmental Biology. – 2015. – Vol. 42. – P. 47-57. doi:https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.04.009.
- 51. Günzel D., Yu A.S. Claudins and the modulation of tight junction permeability // Physiological reviews. – 2013. – Vol. 93. – P. 525-569. doi:10.1152/physrev.00019.2012.
- 52. Van Itallie C.M., Anderson J.M. Claudin interactions in and out of the tight junction
   // Tissue barriers. 2013. Vol. 1. P. e25247. doi:10.4161/tisb.25247.

- Otani T., Furuse M. Tight Junction Structure and Function Revisited // Trends in cell biology. – 2020. – Vol. 30. – P. 805-817. doi:10.1016/j.tcb.2020.08.004.
- 54. Lynch R.D., Francis S.A., McCarthy K.M., Casas E., Thiele C., Schneeberger E.E. Cholesterol depletion alters detergent-specific solubility profiles of selected tight junction proteins and the phosphorylation of occludin // Experimental cell research. - 2007. – Vol. 313. – P. 2597-2610. doi:https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.05.009.
- 55. Vasileva E., Sluysmans S., Bochaton-Piallat M.L., Citi S. Cell-specific diversity in the expression and organization of cytoplasmic plaque proteins of apical junctions // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2017. – Vol. 1405. – P. 160-176. doi:10.1111/nyas.13391.
- Keon B.H., Schäfer S., Kuhn C., Grund C., Franke W.W. Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein // Journal of Cell Biology. – 1996. – Vol. 134. – P. 1003-1018. doi:10.1083/jcb.134.4.1003.
- 57. Chen J., Nekrasova O.E., Patel D.M., Klessner J.L., Godsel L.M., Koetsier J.L., Amargo E.V., Desai B.V., Green K.J. The C-terminal unique region of desmoglein 2 inhibits its internalization via tail-tail interactions // Journal of Cell Biology. 2012. Vol. 199. P. 699-711. doi:10.1083/jcb.201202105.
- Garrod D., Chidgey M. Desmosome structure, composition and function // Biochimica et biophysica acta. – 2008. – Vol. 1778. – P. 572-587. doi:10.1016/j.bbamem.2007.07.014.
- Kowalczyk A.P., Green K.J. Structure, function, and regulation of desmosomes // Prog Mol Biol Transl Sci. – 2013. – Vol. 116. – P. 95-118. doi:10.1016/B978-0-12-394311-8.00005-4.
- Mohammed F., Chidgey M. Desmosomal protein structure and function and the impact of disease-causing mutations // Journal of structural biology. 2021. Vol. 213. P. 107749. doi:10.1016/j.jsb.2021.107749.

- 61. Li P., Meng Y., Wang Y., Li J., Lam M., Wang L., Di L.-J. Nuclear localization of Desmoplakin and its involvement in telomere maintenance // Int J Biol Sci. 2019. Vol. 15. P. 2350-2362. doi:10.7150/ijbs.34450.
- 62. Bazzoun D., Adissu H.A., Wang L., Urazaev A., Tenvooren I., Fostok S.F., Chittiboyina S., Sturgis J., Hodges K., Chandramouly G.; et al. Connexin 43 maintains tissue polarity and regulates mitotic spindle orientation in the breast epithelium // Journal of cell science. – 2019. – Vol. 132. – P. doi:10.1242/jcs.223313.
- 63. Mulkearns-Hubert E.E., Reizes O., Lathia J.D. Connexins in Cancer: Jekyll or Hyde?
  // Biomolecules. 2020. Vol. 10. P. doi:10.3390/biom10121654.
- 64. Abascal F., Zardoya R. Evolutionary analyses of gap junction protein families // Biochimica et biophysica acta. – 2013. – Vol. 1828. – P. 4-14. doi:10.1016/j.bbamem.2012.02.007.
- Skerrett I.M., Williams J.B. A structural and functional comparison of gap junction channels composed of connexins and innexins // Developmental neurobiology. – 2017. – Vol. 77. – P. 522-547. doi:10.1002/dneu.22447.
- Scemes E., Spray D.C. Connexin Expression (Gap Junctions and Hemichannels) in Astrocytes. In Astrocytes in (Patho)Physiology of the Nervous System, Haydon, P.G., Parpura, V., Eds.; Springer US: Boston, MA, 2009; pp. 107-150.
- Bai D., Yue B., Aoyama H. Crucial motifs and residues in the extracellular loops influence the formation and specificity of connexin docking // Biochimica et biophysica acta. Biomembranes. 2018. Vol. 1860. P. 9-21. doi:10.1016/j.bbamem.2017.07.003.
- Retamal M.A., García I.E., Pinto B.I., Pupo A., Báez D., Stehberg J., Del Rio R., González C. Extracellular Cysteine in Connexins: Role as Redox Sensors // Frontiers in physiology. – 2016. – Vol. 7. – P. 1. doi:10.3389/fphys.2016.00001.
- 69. Kyle J.W., Minogue P.J., Thomas B.C., Domowicz D.A., Berthoud V.M., Hanck D.A., Beyer E.C. An intact connexin N-terminus is required for function but not gap

junction formation // Journal of cell science. – 2008. – Vol. 121. – P. 2744-2750. doi:10.1242/jcs.032482.

- 70. Leithe E., Mesnil M., Aasen T. The connexin 43 C-terminus: A tail of many tales // Biochimica et biophysica acta. Biomembranes. – 2018. – Vol. 1860. – P. 48-64. doi:10.1016/j.bbamem.2017.05.008.
- Orré T., Rossier O., Giannone G. The inner life of integrin adhesion sites: From single molecules to functional macromolecular complexes // Experimental cell research. 2019. Vol. 379. P. 235-244. doi:10.1016/j.yexcr.2019.03.036.
- Kanchanawong P., Shtengel G., Pasapera A.M., Ramko E.B., Davidson M.W., Hess H.F., Waterman C.M. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions // Nature. 2010. Vol. 468. P. 580-584. doi:10.1038/nature09621.
- Laukaitis C.M., Webb D.J., Donais K., Horwitz A.F. Differential dynamics of alpha 5 integrin, paxillin, and alpha-actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells // The Journal of cell biology. 2001. Vol. 153. P. 1427-1440. doi:10.1083/jcb.153.7.1427.
- 74. Margadant C., Charafeddine R.A., Sonnenberg A. Unique and redundant functions of integrins in the epidermis // FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. – 2010. – Vol. 24. – P. 4133-4152. doi:10.1096/fj.09-151449.
- 75. Humphries J.D., Wang P., Streuli C., Geiger B., Humphries M.J., Ballestrem C. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin // The Journal of cell biology. 2007. Vol. 179. P. 1043-1057. doi:10.1083/jcb.200703036.
- Zaidel-Bar R., Itzkovitz S., Ma'ayan A., Iyengar R., Geiger B. Functional atlas of the integrin adhesome // Nature cell biology. – 2007. – Vol. 9. – P. 858-867. doi:10.1038/ncb0807-858.

- 77. Bellis S.L., Miller J.T., Turner C.E. Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase // The Journal of biological chemistry. 1995. Vol. 270. P. 17437-17441. doi:10.1074/jbc.270.29.17437.
- Critchley D.R. Biochemical and structural properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin // Annual review of biophysics. – 2009. – Vol. 38. – P. 235-254. doi:10.1146/annurev.biophys.050708.133744.
- 79. Drees B., Friederich E., Fradelizi J., Louvard D., Beckerle M.C., Golsteyn R.M. Characterization of the interaction between zyxin and members of the Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein family of proteins // The Journal of biological chemistry. – 2000. – Vol. 275. – P. 22503-22511. doi:10.1074/jbc.M001698200.
- Small J.V., Rottner K., Kaverina I., Anderson K.I. Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement // Biochimica et biophysica acta. – 1998. – Vol. 1404. – P. 271-281. doi:10.1016/s0167-4889(98)00080-9.
- 81. Balaban N.Q., Schwarz U.S., Riveline D., Goichberg P., Tzur G., Sabanay I., Mahalu D., Safran S., Bershadsky A., Addadi L.; et al. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates // Nature cell biology. – 2001. – Vol. 3. – P. 466-472. doi:10.1038/35074532.
- 82. Owaribe K., Kartenbeck J., Stumpp S., Magin T.M., Krieg T., Diaz L.A., Franke W.W. The hemidesmosomal plaque. I. Characterization of a major constituent protein as a differentiation marker for certain forms of epithelia // Differentiation; research in biological diversity. 1990. Vol. 45. P. 207-220. doi:10.1111/j.1432-0436.1990.tb00475.x.
- Fontao L., Stutzmann J., Gendry P., Launay J.F. Regulation of the type II hemidesmosomal plaque assembly in intestinal epithelial cells // Experimental cell research. – 1999. – Vol. 250. – P. 298-312. doi:10.1006/excr.1999.4549.
- 84. Niemann C., Owens D.M., Hülsken J., Birchmeier W., Watt F.M. Expression of DeltaNLef1 in mouse epidermis results in differentiation of hair follicles into

squamous epidermal cysts and formation of skin tumours // Development (Cambridge, England). – 2002. – Vol. 129. – P. 95-109. doi:10.1242/dev.129.1.95.

- Albuquerque C., Bakker E.R., van Veelen W., Smits R. Colorectal cancers choosing sides // Biochimica et biophysica acta. – 2011. – Vol. 1816. – P. 219-231. doi:10.1016/j.bbcan.2011.07.005.
- Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V.E., Zhou S., Diaz L.A., Jr., Kinzler K.W. Cancer genome landscapes // Science (New York, N.Y.). 2013. Vol. 339. P. 1546-1558. doi:10.1126/science.1235122.
- Cai J., Maitra A., Anders R.A., Taketo M.M., Pan D. β-Catenin destruction complex-independent regulation of Hippo-YAP signaling by APC in intestinal tumorigenesis // Genes & development. – 2015. – Vol. 29. – P. 1493-1506. doi:10.1101/gad.264515.115.
- Yu F.X., Guan K.L. The Hippo pathway: regulators and regulations // Genes & development. 2013. Vol. 27. P. 355-371. doi:10.1101/gad.210773.112.
- Akizuki R., Shimobaba S., Matsunaga T., Endo S., Ikari A. Claudin-5, -7, and -18 suppress proliferation mediated by inhibition of phosphorylation of Akt in human lung squamous cell carcinoma // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research. 2017. Vol. 1864. P. 293-302. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.11.018.
- 90. Zhou B., Flodby P., Luo J., Castillo D.R., Liu Y., Yu F.-X., McConnell A., Varghese B., Li G., Chimge N.-O.; et al. Claudin-18–mediated YAP activity regulates lung stem and progenitor cell homeostasis and tumorigenesis // The Journal of clinical investigation. – 2018. – Vol. 128. – P. 970-984. doi:10.1172/JCI90429.
- Neesse A., Griesmann H., Gress T.M., Michl P. Claudin-4 as therapeutic target in cancer // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2012. – Vol. 524. – P. 64-70. doi:https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.01.009.

- 92. Karanjawala Z.E., Illei P.B., Ashfaq R., Infante J.R., Murphy K., Pandey A., Schulick R., Winter J., Sharma R., Maitra A.; et al. New Markers of Pancreatic Cancer Identified Through Differential Gene Expression Analyses: Claudin 18 and Annexin A8 // The American Journal of Surgical Pathology. – 2008. – Vol. 32. – P.
- 93. Cravo A.S., Carter E., Erkan M., Harvey E., Furutani-Seiki M., Mrsny R. Hippo pathway elements Co-localize with Occludin: A possible sensor system in pancreatic epithelial cells // Tissue barriers. 2015. Vol. 3. P. e1037948. doi:10.1080/21688370.2015.1037948.
- 94. Lima W.R., Parreira K.S., Devuyst O., Caplanusi A., N' Kuli F., Marien B., Van Der Smissen P., Alves P.M.S., Verroust P., Christensen E.I.; et al. ZONAB Promotes Proliferation and Represses Differentiation of Proximal Tubule Epithelial Cells // Journal of the American Society of Nephrology. 2010. Vol. 21. P. 478. doi:10.1681/ASN.2009070698.
- 95. Capaldo C.T., Koch S., Kwon M., Laur O., Parkos C.A., Nusrat A. Tight function zonula occludens-3 regulates cyclin D1–dependent cell proliferation // Molecular biology of the cell. – 2011. – Vol. 22. – P. 1677-1685. doi:10.1091/mbc.e10-08-0677.
- 96. Guillemot L., Citi S. Cingulin Regulates Claudin-2 Expression and Cell Proliferation through the Small GTPase RhoA // Molecular biology of the cell. 2006. Vol. 17. P. 3569-3577. doi:10.1091/mbc.e06-02-0122.
- 97. Perry J.M., He X.C., Sugimura R., Grindley J.C., Haug J.S., Ding S., Li L. Cooperation between both Wnt/{beta}-catenin and PTEN/PI3K/Akt signaling promotes primitive hematopoietic stem cell self-renewal and expansion // Genes & development. 2011. Vol. 25. P. 1928-1942. doi:10.1101/gad.17421911.
- 98. Najor N.A., Fitz G.N., Koetsier J.L., Godsel L.M., Albrecht L.V., Harmon R., Green K.J. Epidermal Growth Factor Receptor neddylation is regulated by a desmosomal-COP9 (Constitutive Photomorphogenesis 9) signalosome complex // eLife. 2017. Vol. 6. P. doi:10.7554/eLife.22599.
- 99. Brennan D., Hu Y., Joubeh S., Choi Y.W., Whitaker-Menezes D., O'Brien T., Uitto J., Rodeck U., Mahoney M.G. Suprabasal Dsg2 expression in transgenic mouse skin confers a hyperproliferative and apoptosis-resistant phenotype to keratinocytes // Journal of cell science. 2007. Vol. 120. P. 758-771. doi:10.1242/jcs.03392.
- 100. Park J., Son Y., Lee N.G., Lee K., Lee D.G., Song J., Lee J., Kim S., Cho M.J., Jang J.H.; et al. DSG2 Is a Functional Cell Surface Marker for Identification and Isolation of Human Pluripotent Stem Cells // Stem cell reports. 2018. Vol. 11. P. 115-127. doi:10.1016/j.stemcr.2018.05.009.
- 101. Ri H., Peiyan Z., Jianqi W., Yunteng Z., Gang L., Baoqing S. Desmoglein 3 gene mediates epidermal growth factor/epidermal growth factor receptor signaling pathway involved in inflammatory response and immune function of anaphylactic rhinitis // Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie. – 2019. – Vol. 118. – P. 109214. doi:10.1016/j.biopha.2019.109214.
- 102. Chen Y.J., Lee L.Y., Chao Y.K., Chang J.T., Lu Y.C., Li H.F., Chiu C.C., Li Y.C., Li Y.L., Chiou J.F.; et al. DSG3 facilitates cancer cell growth and invasion through the DSG3-plakoglobin-TCF/LEF-Myc/cyclin D1/MMP signaling pathway // PloS one. – 2013. – Vol. 8. – P. e64088. doi:10.1371/journal.pone.0064088.
- 103. Uttagomol J., Ahmad U.S., Rehman A., Huang Y., Laly A.C., Kang A., Soetaert J., Chance R., Teh M.T., Connelly J.T.; et al. Evidence for the Desmosomal Cadherin Desmoglein-3 in Regulating YAP and Phospho-YAP in Keratinocyte Responses to Mechanical Forces // International journal of molecular sciences. – 2019. – Vol. 20. – P. doi:10.3390/ijms20246221.
- 104. Yang X., Wang J., Li W.P., Jin Z.J., Liu X.J. Desmocollin 3 mediates follicle stimulating hormone-induced ovarian epithelial cancer cell proliferation by activating the EGFR/Akt signaling pathway // International journal of clinical and experimental pathology. – 2015. – Vol. 8. – P. 6716-6723.
- 105. Spindler V., Dehner C., Hübner S., Waschke J. Plakoglobin but not desmoplakin regulates keratinocyte cohesion via modulation of p38MAPK signaling // The

Journal of investigative dermatology. – 2014. – Vol. 134. – P. 1655-1664. doi:10.1038/jid.2014.21.

- 106. Wan H., South A.P., Hart I.R. Increased keratinocyte proliferation initiated through downregulation of desmoplakin by RNA interference // Experimental cell research.
   2007. Vol. 313. P. 2336-2344. doi:10.1016/j.yexcr.2007.01.010.
- 107. Arimoto K., Burkart C., Yan M., Ran D., Weng S., Zhang D.E. Plakophilin-2 promotes tumor development by enhancing ligand-dependent and -independent epidermal growth factor receptor dimerization and activation // Molecular and cellular biology. – 2014. – Vol. 34. – P. 3843-3854. doi:10.1128/mcb.00758-14.
- 108. Furukawa C., Daigo Y., Ishikawa N., Kato T., Ito T., Tsuchiya E., Sone S., Nakamura Y. Plakophilin 3 oncogene as prognostic marker and therapeutic target for lung cancer // Cancer research. – 2005. – Vol. 65. – P. 7102-7110. doi:10.1158/0008-5472.can-04-1877.
- 109. Chandrasekhar A., Kalmykov E.A., Polusani S.R., Mathis S.A., Zucker S.N., Nicholson B.J. Intercellular redistribution of cAMP underlies selective suppression of cancer cell growth by connexin26 // PloS one. – 2013. – Vol. 8. – P. e82335. doi:10.1371/journal.pone.0082335.
- 110. Suzhi Z., Liang T., Yuexia P., Lucy L., Xiaoting H., Yuan Z., Qin W. Gap Junctions Enhance the Antiproliferative Effect of MicroRNA-124-3p in Glioblastoma Cells // Journal of cellular physiology. – 2015. – Vol. 230. – P. 2476-2488. doi:10.1002/jcp.24982.
- 111. Giepmans B.N., Hengeveld T., Postma F.R., Moolenaar W.H. Interaction of c-Src with gap junction protein connexin-43. Role in the regulation of cell-cell communication // The Journal of biological chemistry. 2001. Vol. 276. P. 8544-8549. doi:10.1074/jbc.M005847200.
- Thuringer D., Boucher J., Jego G., Pernet N., Cronier L., Hammann A., Solary E., Garrido C. Transfer of functional microRNAs between glioblastoma and

microvascular endothelial cells through gap junctions // Oncotarget. – 2016. – Vol. 7. – P. 73925-73934. doi:10.18632/oncotarget.12136.

- 113. Manohar M., Hirsh M.I., Chen Y., Woehrle T., Karande A.A., Junger W.G. ATP release and autocrine signaling through P2X4 receptors regulate γδ T cell activation
  // Journal of leukocyte biology. 2012. Vol. 92. P. 787-794. doi:10.1189/jlb.0312121.
- 114. Bae Y.H., Mui K.L., Hsu B.Y., Liu S.L., Cretu A., Razinia Z., Xu T., Puré E., Assoian R.K. A FAK-Cas-Rac-lamellipodin signaling module transduces extracellular matrix stiffness into mechanosensitive cell cycling // Science signaling. – 2014. – Vol. 7. – P. ra57. doi:10.1126/scisignal.2004838.
- 115. Petridou N.I., Skourides P.A. FAK transduces extracellular forces that orient the mitotic spindle and control tissue morphogenesis // Nat Commun. 2014. Vol. 5. P. 5240. doi:10.1038/ncomms6240.
- 116. Kumar A., Mazzanti M., Mistrik M., Kosar M., Beznoussenko G.V., Mironov A.A., Garrè M., Parazzoli D., Shivashankar G.V., Scita G.; et al. ATR mediates a checkpoint at the nuclear envelope in response to mechanical stress // Cell. – 2014. – Vol. 158. – P. 633-646. doi:10.1016/j.cell.2014.05.046.
- 117. Aragona M., Panciera T., Manfrin A., Giulitti S., Michielin F., Elvassore N., Dupont S., Piccolo S. A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors // Cell. 2013. Vol. 154. P. 1047-1059. doi:10.1016/j.cell.2013.07.042.
- 118. Alexandrova A.Y., Chikina A.S., Svitkina T.M. Actin cytoskeleton in mesenchymalto-amoeboid transition of cancer cells // Int Rev Cell Mol Biol. – 2020. – Vol. 356. – P. 197-256. doi:10.1016/bs.ircmb.2020.06.002.
- 119. Lee H.-S., Anekal P., Lim C.J., Liu C.-C., Ginsberg M.H. Two modes of integrin activation form a binary molecular switch in adhesion maturation // Molecular biology of the cell. – 2013. – Vol. 24. – P. 1354-1362.

- 120. Auernheimer V., Lautscham L.A., Leidenberger M., Friedrich O., Kappes B., Fabry B., Goldmann W.H. Vinculin phosphorylation at residues Y100 and Y1065 is required for cellular force transmission // Journal of cell science. 2015. Vol. 128. P. 3435-3443. doi:10.1242/jcs.172031.
- 121. De Pascalis C., Etienne-Manneville S. Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions // Molecular biology of the cell. – 2017. – Vol. 28. – P. 1833-1846. doi:10.1091/mbc.e17-03-0134.
- 122. Tetley R.J., Staddon M.F., Heller D., Hoppe A., Banerjee S., Mao Y. Tissue Fluidity Promotes Epithelial Wound Healing // Nature physics. – 2019. – Vol. 15. – P. 1195-1203. doi:10.1038/s41567-019-0618-1.
- 123. Ozawa M., Hiver S., Yamamoto T., Shibata T., Upadhyayula S., Mimori-Kiyosue Y., Takeichi M. Adherens junction regulates cryptic lamellipodia formation for epithelial cell migration // The Journal of cell biology. – 2020. – Vol. 219. – P. doi:10.1083/jcb.202006196.
- 124. Tuomi S., Mai A., Nevo J., Laine J.O., Vilkki V., Ohman T.J., Gahmberg C.G., Parker P.J., Ivaska J. PKCepsilon regulation of an alpha5 integrin-ZO-1 complex controls lamellae formation in migrating cancer cells // Science signaling. – 2009. – Vol. 2. – P. ra32. doi:10.1126/scisignal.2000135.
- 125. Severson E.A., Jiang L., Ivanov A.I., Mandell K.J., Nusrat A., Parkos C.A. Cisdimerization mediates function of junctional adhesion molecule A // Molecular biology of the cell. – 2008. – Vol. 19. – P. 1862-1872. doi:10.1091/mbc.e07-09-0869.
- 126. Shiozaki A., Bai X.-h., Shen-Tu G., Moodley S., Takeshita H., Fung S.-Y., Wang Y., Keshavjee S., Liu M. Claudin 1 mediates TNFα-induced gene expression and cell migration in human lung carcinoma cells // PloS one. – 2012. – Vol. 7. – P. e38049e38049. doi:10.1371/journal.pone.0038049.
- 127. Pope J.L., Bhat A.A., Sharma A., Ahmad R., Krishnan M., Washington M.K., Beauchamp R.D., Singh A.B., Dhawan P. Claudin-1 regulates intestinal epithelial

homeostasis through the modulation of Notch-signalling // Gut. – 2014. – Vol. 63. – P. 622. doi:10.1136/gutjnl-2012-304241.

- 128. Aijaz S., D'Atri F., Citi S., Balda M.S., Matter K. Binding of GEF-H1 to the tight junction-associated adaptor cingulin results in inhibition of Rho signaling and G1/S phase transition // Developmental cell. – 2005. – Vol. 8. – P. 777-786. doi:10.1016/j.devcel.2005.03.003.
- Ilina O., Friedl P. Mechanisms of collective cell migration at a glance // Journal of cell science. – 2009. – Vol. 122. – P. 3203-3208. doi:10.1242/jcs.036525.
- 130. Fülle J.B., Huppert H., Liebl D., Liu J., Alves de Almeida R., Yanes B., Wright G.D., Lane E.B., Garrod D.R., Ballestrem C. Desmosome dualism – most of the junction is stable, but a plakophilin moiety is persistently dynamic // Journal of cell science. – 2021. – Vol. 134. – P. doi:10.1242/jcs.258906.
- 131. Khalil A.A., Ilina O., Vasaturo A., Venhuizen J.H., Vullings M., Venhuizen V., Bilos A., Figdor C.G., Span P.N., Friedl P. Collective invasion induced by an autocrine purinergic loop through connexin-43 hemichannels // The Journal of cell biology. – 2020. – Vol. 219. – P. doi:10.1083/jcb.201911120.
- 132. Boucher J., Balandre A.C., Debant M., Vix J., Harnois T., Bourmeyster N., Péraudeau E., Chépied A., Clarhaut J., Debiais F.; et al. Cx43 Present at the Leading Edge Membrane Governs Promigratory Effects of Osteoblast-Conditioned Medium on Human Prostate Cancer Cells in the Context of Bone Metastasis // Cancers. – 2020. – Vol. 12. – P. doi:10.3390/cancers12103013.
- 133. Burandt E., Lübbersmeyer F., Gorbokon N., Büscheck F., Luebke A.M., Menz A., Kluth M., Hube-Magg C., Hinsch A., Höflmayer D.; et al. E-Cadherin expression in human tumors: a tissue microarray study on 10,851 tumors // Biomarker research. – 2021. – Vol. 9. – P. 44. doi:10.1186/s40364-021-00299-4.
- 134. Motti M.L., Califano D., Baldassarre G., Celetti A., Merolla F., Forzati F., Napolitano M., Tavernise B., Fusco A., Viglietto G. Reduced E-cadherin expression contributes to the loss of p27 kip1 -mediated mechanism of contact inhibition in

thyroid anaplastic carcinomas // Carcinogenesis. – 2005. – Vol. 26. – P. 1021-1034. doi:10.1093/carcin/bgi050.

- 135. Lu M., Marsters S., Ye X., Luis E., Gonzalez L., Ashkenazi A. E-Cadherin Couples Death Receptors to the Cytoskeleton to Regulate Apoptosis // Molecular cell. – 2014.
  – Vol. 54. – P. 987-998. doi:https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.04.029.
- 136. Chao Y., Wu Q., Shepard C., Wells A. Hepatocyte induced re-expression of Ecadherin in breast and prostate cancer cells increases chemoresistance // Clinical & experimental metastasis. – 2012. – Vol. 29. – P. 39-50. doi:10.1007/s10585-011-9427-3.
- 137. Hulit J., Suyama K., Chung S., Keren R., Agiostratidou G., Shan W., Dong X., Williams T.M., Lisanti M.P., Knudsen K. N-cadherin signaling potentiates mammary tumor metastasis via enhanced extracellular signal-regulated kinase activation // Cancer research. – 2007. – Vol. 67. – P. 3106-3116.
- Walker A., Frei R., Lawson K.R. The cytoplasmic domain of N-cadherin modulates MMP-9 induction in oral squamous carcinoma cells // International journal of oncology. – 2014. – Vol. 45. – P. 1699-1706.
- 139. Rezaei M., Friedrich K., Wielockx B., Kuzmanov A., Kettelhake A., Labelle M., Schnittler H., Baretton G., Breier G. Interplay between neural-cadherin and vascular endothelial-cadherin in breast cancer progression // Breast Cancer Research. – 2012. – Vol. 14. – P. 1-15.
- 140. Derycke L., Morbidelli L., Ziche M., De Wever O., Bracke M., Van Aken E. Soluble N-cadherin fragment promotes angiogenesis // Clinical & experimental metastasis. – 2006. – Vol. 23. – P. 187-201. doi:10.1007/s10585-006-9029-7.
- 141. Nalla A.K., Estes N., Patel J., Rao J.S. N-cadherin mediates angiogenesis by regulating monocyte chemoattractant protein-1 expression via PI3K/Akt signaling in prostate cancer cells // Experimental cell research. – 2011. – Vol. 317. – P. 2512-2521. doi:https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.07.024.

- 142. Asano K., Duntsch C.D., Zhou Q., Weimar J.D., Bordelon D., Robertson J.H., Pourmotabbed T. Correlation of N-cadherin expression in high grade gliomas with tissue invasion // Journal of neuro-oncology. – 2004. – Vol. 70. – P. 3-15.
- 143. Camand E., Peglion F., Osmani N., Sanson M., Etienne-Manneville S. N-cadherin expression level modulates integrin-mediated polarity and strongly impacts on the speed and directionality of glial cell migration // Journal of cell science. – 2012. – Vol. 125. – P. 844-857. doi:10.1242/jcs.087668.
- 144. Labernadie A., Kato T., Brugués A., Serra-Picamal X., Derzsi S., Arwert E., Weston A., González-Tarragó V., Elosegui-Artola A., Albertazzi L.; et al. A mechanically active heterotypic E-cadherin/N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion // Nature cell biology. 2017. Vol. 19. P. 224-237. doi:10.1038/ncb3478.
- 145. Hazan R.B., Phillips G.R., Qiao R.F., Norton L., Aaronson S.A. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis // The Journal of cell biology. – 2000. – Vol. 148. – P. 779-790. doi:10.1083/jcb.148.4.779.
- 146. Brock T., Boudriot E., Klawitter A., Großer M., Nguyen T.T.P., Giebe S., Klapproth E., Temme A., El-Armouche A., Breier G. The Influence of VE-Cadherin on Adhesion and Incorporation of Breast Cancer Cells into Vascular Endothelium // International journal of molecular sciences. 2021. Vol. 22. P. doi:10.3390/ijms22116049.
- 147. Hu Q.P., Kuang J.Y., Yang Q.K., Bian X.W., Yu S.C. Beyond a tumor suppressor: Soluble E-cadherin promotes the progression of cancer // International journal of cancer. – 2016. – Vol. 138. – P. 2804-2812. doi:10.1002/ijc.29982.
- 148. Tang M.K.S., Yue P.Y.K., Ip P.P., Huang R.-L., Lai H.-C., Cheung A.N.Y., Tse K.Y., Ngan H.Y.S., Wong A.S.T. Soluble E-cadherin promotes tumor angiogenesis and localizes to exosome surface // Nature Communications. 2018. Vol. 9. P. 2270. doi:10.1038/s41467-018-04695-7.

- 149. Christgen M., Bartels S., van Luttikhuizen J.L., Bublitz J., Rieger L.U., Christgen H., Stark H., Sander B., Lehmann U., Steinemann D.; et al. E-cadherin to P-cadherin switching in lobular breast cancer with tubular elements // Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. – 2020. – Vol. 33. – P. 2483-2498. doi:10.1038/s41379-020-0591-3.
- Margan M.M., Cimpean A.M., Ceausu A.R., Raica M. Differential Expression of E-Cadherin and P-Cadherin in Breast Cancer Molecular Subtypes // Anticancer research. – 2020. – Vol. 40. – P. 5557-5566. doi:10.21873/anticanres.14568.
- 151. Salvador E., Burek M., Förster C.Y. Tight Junctions and the Tumor Microenvironment // Current pathobiology reports. – 2016. – Vol. 4. – P. 135-145. doi:10.1007/s40139-016-0106-6.
- 152. Zhou B., Flodby P., Luo J., Castillo D.R., Liu Y., Yu F.X., McConnell A., Varghese B., Li G., Chimge N.O.; et al. Claudin-18-mediated YAP activity regulates lung stem and progenitor cell homeostasis and tumorigenesis // The Journal of clinical investigation. 2018. Vol. 128. P. 970-984. doi:10.1172/jci90429.
- 153. Shimobaba S., Taga S., Akizuki R., Hichino A., Endo S., Matsunaga T., Watanabe R., Yamaguchi M., Yamazaki Y., Sugatani J.; et al. Claudin-18 inhibits cell proliferation and motility mediated by inhibition of phosphorylation of PDK1 and Akt in human lung adenocarcinoma A549 cells // Biochimica et biophysica acta. 2016. Vol. 1863. P. 1170-1178. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.02.015.
- 154. Dhawan P., Ahmad R., Chaturvedi R., Smith J.J., Midha R., Mittal M.K., Krishnan M., Chen X., Eschrich S., Yeatman T.J.; et al. Claudin-2 expression increases tumorigenicity of colon cancer cells: role of epidermal growth factor receptor activation // Oncogene. 2011. Vol. 30. P. 3234-3247. doi:10.1038/onc.2011.43.
- 155. Singh A.B., Sharma A., Dhawan P. Claudin-1 expression confers resistance to anoikis in colon cancer cells in a Src-dependent manner // Carcinogenesis. – 2012. – Vol. 33. – P. 2538-2547. doi:10.1093/carcin/bgs275.

- 156. Pope J.L., Ahmad R., Bhat A.A., Washington M.K., Singh A.B., Dhawan P. Claudin-1 overexpression in intestinal epithelial cells enhances susceptibility to adenamatous polyposis coli-mediated colon tumorigenesis // Molecular Cancer. 2014. Vol. 13. P. 167. doi:10.1186/1476-4598-13-167.
- 157. Lin X., Shang X., Manorek G., Howell S.B. Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition by Claudin-3 and Claudin-4 // PloS one. – 2013. – Vol. 8. – P. e67496. doi:10.1371/journal.pone.0067496.
- 158. Bhat A.A., Pope J.L., Smith J.J., Ahmad R., Chen X., Washington M.K., Beauchamp R.D., Singh A.B., Dhawan P. Claudin-7 expression induces mesenchymal to epithelial transformation (MET) to inhibit colon tumorigenesis // Oncogene. – 2015. – Vol. 34. – P. 4570-4580. doi:10.1038/onc.2014.385.
- 159. Lu Z., Ding L., Hong H., Hoggard J., Lu Q., Chen Y.-H. Claudin-7 inhibits human lung cancer cell migration and invasion through ERK/MAPK signaling pathway // Experimental cell research. – 2011. – Vol. 317. – P. 1935-1946. doi:https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.05.019.
- 160. Lioni M., Brafford P., Andl C., Rustgi A., El-Deiry W., Herlyn M., Smalley K.S. Dysregulation of claudin-7 leads to loss of E-cadherin expression and the increased invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells // The American journal of pathology. – 2007. – Vol. 170. – P. 709-721. doi:10.2353/ajpath.2007.060343.
- 161. Suh Y., Yoon C.H., Kim R.K., Lim E.J., Oh Y.S., Hwang S.G., An S., Yoon G., Gye M.C., Yi J.M.; et al. Claudin-1 induces epithelial–mesenchymal transition through activation of the c-Abl-ERK signaling pathway in human liver cells // Oncogene. 2013. Vol. 32. P. 4873-4882. doi:10.1038/onc.2012.505.
- 162. Ikari A., Sato T., Watanabe R., Yamazaki Y., Sugatani J. Increase in claudin-2 expression by an EGFR/MEK/ERK/c-Fos pathway in lung adenocarcinoma A549 cells // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. – 2012. – Vol. 1823. – P. 1110-1118. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.04.005.

- 163. Dhawan P., Singh A.B., Deane N.G., No Y., Shiou S.R., Schmidt C., Neff J., Washington M.K., Beauchamp R.D. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer // The Journal of clinical investigation. – 2005. – Vol. 115. – P. 1765-1776. doi:10.1172/jci24543.
- 164. D'Souza T., Indig F.E., Morin P.J. Phosphorylation of claudin-4 by PKCε regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells // Experimental cell research. – 2007. – Vol. 313. – P. 3364-3375. doi:https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.06.026.
- 165. Kyuno D., Kojima T., Ito T., Yamaguchi H., Tsujiwaki M., Takasawa A., Murata M., Tanaka S., Hirata K., Sawada N. Protein kinase Cα inhibitor enhances the sensitivity of human pancreatic cancer HPAC cells to Clostridium perfringens enterotoxin via claudin-4 // Cell and Tissue Research. – 2011. – Vol. 346. – P. 369-381. doi:10.1007/s00441-011-1287-2.
- 166. Wang M., Liu Y., Qian X., Wei N., Tang Y., Yang J. Downregulation of occludin affects the proliferation, apoptosis and metastatic properties of human lung carcinoma // Oncology reports. – 2018. – Vol. 40. – P. 454-462. doi:10.3892/or.2018.6408.
- 167. Chidgey M., Dawson C. Desmosomes: a role in cancer? // British Journal of Cancer.
  2007. Vol. 96. P. 1783-1787. doi:10.1038/sj.bjc.6603808.
- 168. Kolegraff K., Nava P., Helms M.N., Parkos C.A., Nusrat A. Loss of desmocollin-2 confers a tumorigenic phenotype to colonic epithelial cells through activation of Akt/β-catenin signaling // Molecular biology of the cell. – 2011. – Vol. 22. – P. 1121-1134. doi:10.1091/mbc.E10-10-0845.
- 169. Cui T., Chen Y., Yang L., Knösel T., Huber O., Pacyna-Gengelbach M., Petersen I. The p53 target gene desmocollin 3 acts as a novel tumor suppressor through inhibiting EGFR/ERK pathway in human lung cancer // Carcinogenesis. – 2012. – Vol. 33. – P. 2326-2333. doi:10.1093/carcin/bgs273.
- Faktor J., Knopfova L., Lapcik P., Janacova L., Paralova V., Bouchalova P., Muller
   P., Benes P., Bouchal P. Proteomics Identification and Validation of Desmocollin-1

and Catechol-O-Methyltransferase as Proteins Associated with Breast Cancer Cell Migration and Metastasis // Proteomics. – 2019. – Vol. 19. – P. 1900073. doi:https://doi.org/10.1002/pmic.201900073.

- 171. Hütz K., Zeiler J., Sachs L., Ormanns S., Spindler V. Loss of desmoglein 2 promotes tumorigenic behavior in pancreatic cancer cells // Molecular carcinogenesis. 2017. Vol. 56. P. 1884-1895. doi:10.1002/mc.22644.
- 172. Lee S.H., Kim J.M., Lee D.G., Lee J., Park J.G., Han T.S., Cho H.S., Cho Y.L., Bae K.H., Park Y.J.; et al. Loss of desmoglein-2 promotes gallbladder carcinoma progression and resistance to EGFR-targeted therapy through Src kinase activation // Cell death and differentiation. 2021. Vol. 28. P. 968-984. doi:10.1038/s41418-020-00628-4.
- 173. Wong M.P., Cheang M., Yorida E., Coldman A., Gilks C.B., Huntsman D., Berean K. Loss of desmoglein 1 expression associated with worse prognosis in head and neck squamous cell carcinoma patients // Pathology. 2008. Vol. 40. P. 611-616. doi:https://doi.org/10.1080/00313020802320614.
- 174. Cai F., Zhu Q., Miao Y., Shen S., Su X., Shi Y. Desmoglein-2 is overexpressed in non-small cell lung cancer tissues and its knockdown suppresses NSCLC growth by regulation of p27 and CDK2 // Journal of cancer research and clinical oncology. – 2017. – Vol. 143. – P. 59-69. doi:10.1007/s00432-016-2250-0.
- 175. Ebert L.M., Vandyke K., Johan M.Z., DeNichilo M., Tan L.Y., Myo Min K.K., Weimann B.M., Ebert B.W., Pitson S.M., Zannettino A.C.W.; et al. Desmoglein-2 expression is an independent predictor of poor prognosis patients with multiple myeloma // Molecular oncology. – 2022. – Vol. 16. – P. 1221-1240. doi:10.1002/1878-0261.13055.
- 176. Brown L., Waseem A., Cruz I.N., Szary J., Gunic E., Mannan T., Unadkat M., Yang M., Valderrama F., O'Toole E.A.; et al. Desmoglein 3 promotes cancer cell migration and invasion by regulating activator protein 1 and protein kinase C-

dependent-Ezrin activation // Oncogene. – 2014. – Vol. 33. – P. 2363-2374. doi:10.1038/onc.2013.186.

- 177. Miravet S., Piedra J., Miró F., Itarte E., García de Herreros A., Duñach M. The Transcriptional Factor Tcf-4 Contains Different Binding Sites for β-Catenin and Plakoglobin\* // Journal of Biological Chemistry. – 2002. – Vol. 277. – P. 1884-1891. doi:https://doi.org/10.1074/jbc.M110248200.
- 178. Alaee M., Danesh G., Pasdar M. Plakoglobin Reduces the in vitro Growth, Migration and Invasion of Ovarian Cancer Cells Expressing N-Cadherin and Mutant p53 // PloS one. – 2016. – Vol. 11. – P. e0154323. doi:10.1371/journal.pone.0154323.
- 179. Nweke E., Ntwasa M., Brand M., Devar J., Smith M., Candy G. Increased expression of plakoglobin is associated with upregulated MAPK and PI3K/AKT signalling pathways in early resectable pancreatic ductal adenocarcinoma // Oncology letters. – 2020. – Vol. 19. – P. 4133-4141. doi:10.3892/ol.2020.11473.
- 180. Schwarz J., Ayim A., Schmidt A., Jäger S., Koch S., Baumann R., Dünne A.A., Moll R. Differential expression of desmosomal plakophilins in various types of carcinomas: correlation with cell type and differentiation // Human pathology. – 2006. – Vol. 37. – P. 613-622. doi:10.1016/j.humpath.2006.01.013.
- 181. Aigner K., Descovich L., Mikula M., Sultan A., Dampier B., Bonné S., van Roy F., Mikulits W., Schreiber M., Brabletz T.; et al. The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) represses Plakophilin 3 during human cancer progression // FEBS letters. 2007. Vol. 581. P. 1617-1624. doi:10.1016/j.febslet.2007.03.026.
- 182. Martin-Padron J., Boyero L., Rodriguez M.I., Andrades A., Díaz-Cano I., Peinado P., Baliñas-Gavira C., Alvarez-Perez J.C., Coira I.F., Fárez-Vidal M.E.; et al. Plakophilin 1 enhances MYC translation, promoting squamous cell lung cancer // Oncogene. – 2020. – Vol. 39. – P. 5479-5493. doi:10.1038/s41388-019-1129-3.
- 183. Yang L., Chen Y., Cui T., Knösel T., Zhang Q., Albring K.F., Huber O., Petersen I. Desmoplakin acts as a tumor suppressor by inhibition of the Wnt/β-catenin signaling

pathway in human lung cancer // Carcinogenesis. – 2012. – Vol. 33. – P. 1863-1870. doi:10.1093/carcin/bgs226.

- 184. Alarcon-Martinez L., Villafranca-Baughman D., Quintero H., Kacerovsky J.B., Dotigny F., Murai K.K., Prat A., Drapeau P., Di Polo A. Interpericyte tunnelling nanotubes regulate neurovascular coupling // Nature. – 2020. – Vol. 585. – P. 91-95. doi:10.1038/s41586-020-2589-x.
- Carmeliet E. Conduction in cardiac tissue. Historical reflections // Physiological Reports. – 2019. – Vol. 7. – P. e13860. doi:https://doi.org/10.14814/phy2.13860.
- 186. McEvoy E., Han Y.L., Guo M., Shenoy V.B. Gap junctions amplify spatial variations in cell volume in proliferating tumor spheroids // Nature Communications. 2020. Vol. 11. P. 6148. doi:10.1038/s41467-020-19904-5.
- 187. Gong K., Hong Q., Wu H., Wang F., Zhong L., Shen L., Xu P., Zhang W., Cao H., Zhan Y.Y.; et al. Gap junctions mediate glucose transfer to promote colon cancer growth in three-dimensional spheroid culture // Cancer letters. – 2022. – Vol. 531. – P. 27-38. doi:10.1016/j.canlet.2022.01.023.
- 188. Wang H., Tian L., Liu J., Goldstein A., Bado I., Zhang W., Arenkiel B.R., Li Z., Yang M., Du S.; et al. The Osteogenic Niche Is a Calcium Reservoir of Bone Micrometastases and Confers Unexpected Therapeutic Vulnerability // Cancer cell. – 2018. – Vol. 34. – P. 823-839.e827. doi:10.1016/j.ccell.2018.10.002.
- 189. Waning D.L., Guise T.A., Mohammad K.S. A "Connexin" Responsible for the Fatal Attraction of Cancer to Bone // Cell metabolism. – 2019. – Vol. 29. – P. 6-8. doi:10.1016/j.cmet.2018.12.014.
- 190. Hong X., Sin W.C., Harris A.L., Naus C.C. Gap junctions modulate glioma invasion by direct transfer of microRNA // Oncotarget. – 2015. – Vol. 6. – P. 15566-15577. doi:10.18632/oncotarget.3904.
- 191. Figueira I., Galego S., Custódio-Santos T., Vicente R., Molnár K., Haskó J., MalhóR., Videira M., Wilhelm I., Krizbai I.; et al. Picturing Breast Cancer Brain

Metastasis Development to Unravel Molecular Players and Cellular Crosstalk // Cancers. – 2021. – Vol. 13. – P. doi:10.3390/cancers13040910.

- 192. Lee H.Y., Cha J., Kim S.K., Park J.H., Song K.H., Kim P., Kim M.Y. c-MYC Drives Breast Cancer Metastasis to the Brain, but Promotes Synthetic Lethality with TRAIL // Molecular cancer research : MCR. – 2019. – Vol. 17. – P. 544-554. doi:10.1158/1541-7786.mcr-18-0630.
- 193. Dilley T.K., Bowden G.T., Chen Q.M. Novel mechanisms of sublethal oxidant toxicity: induction of premature senescence in human fibroblasts confers tumor promoter activity // Experimental cell research. – 2003. – Vol. 290. – P. 38-48. doi:10.1016/s0014-4827(03)00308-2.
- 194. Stuhlmann D., Ale-Agha N., Reinehr R., Steinbrenner H., Ramos M.C., Sies H., Brenneisen P. Modulation of homologous gap junctional intercellular communication of human dermal fibroblasts via a paracrine factor(s) generated by squamous tumor cells // Carcinogenesis. – 2003. – Vol. 24. – P. 1737-1748. doi:10.1093/carcin/bgg153.
- 195. Essa A.A., Yamazaki M., Maruyama S., Abé T., Babkair H., Raghib A.M., Megahed E.M., Cheng J., Saku T. Tumour-associated macrophages are recruited and differentiated in the neoplastic stroma of oral squamous cell carcinoma // Pathology. 2016. Vol. 48. P. 219-227. doi:10.1016/j.pathol.2016.02.006.
- 196. Dongre A., Weinberg R.A. New insights into the mechanisms of epithelialmesenchymal transition and implications for cancer // Nature reviews. Molecular cell biology. – 2019. – Vol. 20. – P. 69-84. doi:10.1038/s41580-018-0080-4.
- 197. Wang C., Zhang S., Liu J., Tian Y., Ma B., Xu S., Fu Y., Luo Y. Secreted Pyruvate Kinase M2 Promotes Lung Cancer Metastasis through Activating the Integrin Beta1/FAK Signaling Pathway // Cell reports. – 2020. – Vol. 30. – P. 1780-1797.e1786. doi:10.1016/j.celrep.2020.01.037.
- 198. Sun Q., Lesperance J., Wettersten H., Luterstein E., DeRose Y.S., Welm A., Cheresh D.A., Desgrosellier J.S. Proapoptotic PUMA targets stem-like breast cancer

cells to suppress metastasis // The Journal of clinical investigation. – 2018. – Vol. 128. – P. 531-544. doi:10.1172/jci93707.

- 199. Saunders J.T., Schwarzbauer J.E. Fibronectin matrix as a scaffold for procollagen proteinase binding and collagen processing // Molecular biology of the cell. 2019. Vol. 30. P. 2218-2226. doi:10.1091/mbc.E19-03-0140.
- 200. Attieh Y., Clark A.G., Grass C., Richon S., Pocard M., Mariani P., Elkhatib N., Betz T., Gurchenkov B., Vignjevic D.M. Cancer-associated fibroblasts lead tumor invasion through integrin-β3-dependent fibronectin assembly // The Journal of cell biology. 2017. Vol. 216. P. 3509-3520. doi:10.1083/jcb.201702033.
- 201. Erdogan B., Ao M., White L.M., Means A.L., Brewer B.M., Yang L., Washington M.K., Shi C., Franco O.E., Weaver A.M.; et al. Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin // The Journal of cell biology. 2017. Vol. 216. P. 3799-3816. doi:10.1083/jcb.201704053.
- 202. Primac I., Maquoi E., Blacher S., Heljasvaara R., Van Deun J., Smeland H.Y., Canale A., Louis T., Stuhr L., Sounni N.E.; et al. Stromal integrin α11 regulates PDGFR-β signaling and promotes breast cancer progression // The Journal of clinical investigation. – 2019. – Vol. 129. – P. 4609-4628. doi:10.1172/jci125890.
- 203. Sangaletti S., Tripodo C., Santangelo A., Castioni N., Portararo P., Gulino A., Botti L., Parenza M., Cappetti B., Orlandi R.; et al. Mesenchymal Transition of High-Grade Breast Carcinomas Depends on Extracellular Matrix Control of Myeloid Suppressor Cell Activity // Cell reports. 2016. Vol. 17. P. 233-248. doi:10.1016/j.celrep.2016.08.075.
- 204. Francis H., Kennedy L., Alpini G. Dual ablation of β- and γ-catenin: Critical regulators of junctions and their functions // Hepatology (Baltimore, Md.). 2018. Vol. 67. P. 2079-2081. doi:10.1002/hep.29761.
- 205. Shigetomi K., Ikenouchi J. Cell Adhesion Structures in Epithelial Cells Are Formed in Dynamic and Cooperative Ways // BioEssays : news and reviews in molecular,

cellular and developmental biology. – 2019. – Vol. 41. – P. e1800227. doi:10.1002/bies.201800227.

- 206. Strauss R.E., Gourdie R.G. Cx43 and the Actin Cytoskeleton: Novel Roles and Implications for Cell-Cell Junction-Based Barrier Function Regulation // Biomolecules. 2020. Vol. 10. P. 1656.
- 207. Green K.J., Jaiganesh A., Broussard J.A. Desmosomes: Essential contributors to an integrated intercellular junction network // F1000Research. 2019. Vol. 8. P. doi:10.12688/f1000research.20942.1.
- 208. Wieduwilt M.J., Moasser M.M. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics // Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2008. Vol. 65. P. 1566-1584. doi:10.1007/s00018-008-7440-8.
- 209. Kruser T.J., Wheeler D.L. Mechanisms of resistance to HER family targeting antibodies // Experimental cell research. 2010. Vol. 316. P. 1083-1100. doi:10.1016/j.yexcr.2010.01.009.
- 210. Zeng P., Sun S., Li R., Xiao Z.-X., Chen H. HER2 Upregulates ATF4 to Promote Cell Migration via Activation of ZEB1 and Downregulation of E-Cadherin // International journal of molecular sciences. – 2019. – Vol. 20. – P. 2223.
- 211. Qian X., Anzovino A., Kim S., Suyama K., Yao J., Hulit J., Agiostratidou G., Chandiramani N., McDaid H.M., Nagi C.; et al. N-cadherin/FGFR promotes metastasis through epithelial-to-mesenchymal transition and stem/progenitor celllike properties // Oncogene. – 2014. – Vol. 33. – P. 3411-3421. doi:10.1038/onc.2013.310.
- 212. Popova O.P., Kuznetsova A.V., Bogomazova S.Y., Ivanov A.A. [Is there a claudinlow phenotype of breast cancer?] // Arkhiv patologii. – 2022. – Vol. 84. – P. 45-49. doi:10.17116/patol20228401145.
- 213. Giri S., Poindexter K.M., Sundar S.N., Firestone G.L. Arecoline induced disruption of expression and localization of the tight junctional protein ZO-1 is dependent on

the HER 2 expression in human endometrial Ishikawa cells // BMC Cell Biology. – 2010. – Vol. 11. – P. 53. doi:10.1186/1471-2121-11-53.

- 214. Czerwenka K.F., Manavi M., Hosmann J., Jelincic D., Pischinger K.I., Battistutti W.B., Behnam M., Kubista E. Comparative analysis of two-dimensional protein patterns in malignant and normal human breast tissue // Cancer detection and prevention. 2001. Vol. 25. P. 268-279.
- 215. Wang H., Li Z., Yumul R., Lara S., Hemminki A., Fender P., Lieber A. Multimerization of adenovirus serotype 3 fiber knob domains is required for efficient binding of virus to desmoglein 2 and subsequent opening of epithelial junctions // Journal of virology. – 2011. – Vol. 85. – P. 6390-6402. doi:10.1128/jvi.00514-11.
- 216. Kamekura R., Nava P., Feng M., Quiros M., Nishio H., Weber D.A., Parkos C.A., Nusrat A. Inflammation-induced desmoglein-2 ectodomain shedding compromises the mucosal barrier // Molecular biology of the cell. – 2015. – Vol. 26. – P. 3165-3177. doi:10.1091/mbc.e15-03-0147.
- 217. Yeh E.S., Williams C.J., Williams C.B., Bonilla I.V., Klauber-DeMore N., Phillips S.L. Dysregulated connexin 43 in HER2-positive drug resistant breast cancer cells enhances proliferation and migration // Oncotarget. 2017. Vol. 8. P. 109358-109369. doi:10.18632/oncotarget.22678.
- 218. Fujimoto E., Satoh H., Negishi E., Ueno K., Nagashima Y., Hagiwara K., Yamasaki H., Yano T. Negative growth control of renal cell carcinoma cell by connexin 32: possible involvement of Her-2 // Molecular carcinogenesis. 2004. Vol. 40. P. 135-142. doi:10.1002/mc.20025.
- 219. Ramovs V., Secades P., Song J.-Y., Thijssen B., Kreft M., Sonnenberg A. Absence of integrin α3β1 promotes the progression of HER2-driven breast cancer in vivo // Breast Cancer Res. 2019. Vol. 21. P. 63-63. doi:10.1186/s13058-019-1146-8.

- 220. Li Q., Peng K., Chen E., Jiang H., Wang Y., Yu S., Li W., Yu Y., Liu T. IntegrinB5 upregulated by HER2 in gastric cancer: a promising biomarker for liver metastasis // Ann Transl Med. – 2020. – Vol. 8. – P. 451. doi:10.21037/atm.2020.03.184.
- 221. Hanker A.B., Estrada M.V., Bianchini G., Moore P.D., Zhao J., Cheng F., Koch J.P., Gianni L., Tyson D.R., Sánchez V.; et al. Extracellular Matrix/Integrin Signaling Promotes Resistance to Combined Inhibition of HER2 and PI3K in HER2(+) Breast Cancer // Cancer research. – 2017. – Vol. 77. – P. 3280-3292. doi:10.1158/0008-5472.can-16-2808.
- Hung M.-C., Zhang X., Yan D.-H., Zhang H.-Z., He G.-p., Zhang T.-q., Shi D.-r. Aberrant expression of the c-erbB-2/neu protooncogene in ovarian cancer // Cancer letters. 1992. Vol. 61. P. 95-103. doi:https://doi.org/10.1016/0304-3835(92)90166-S.
- Zdobnova T., Sokolova E., Stremovskiy O., Karpenko D., Telford W., Turchin I., Balalaeva I., Deyev S. A novel far-red fluorescent xenograft model of ovarian carcinoma for preclinical evaluation of HER2-targeted immunotoxins // Oncotarget. - 2015. – Vol. 6. – P. 30919-30928. doi:10.18632/oncotarget.5130.
- 224. Yu D., Wolf J.K., Scanlon M., Price J.E., Hung M.C. Enhanced c-erbB-2/neu expression in human ovarian cancer cells correlates with more severe malignancy that can be suppressed by E1A // Cancer research. 1993. Vol. 53. P. 891-898.
- 225. Proshkina G.M., Kiseleva D.V., Shilova O.N., Ryabova A.V., Shramova E.I., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. [Bifunctional Toxin DARP-LoPE Based on the HER2-Specific Innovative Module of a Non-Immunoglobulin Scaffold as a Promising Agent for Theranostics] // Molekuliarnaia biologiia. – 2017. – Vol. 51. – P. 997-1007. doi:10.7868/s0026898417060118.
- 226. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227. P. 680-685. doi:10.1038/227680a0.

126

- 227. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays // Journal of Immunological Methods. 1983. Vol. 65. P. 55-63. doi:https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- 228. Leelatian N., Doxie D.B., Greenplate A.R., Sinnaeve J., Ihrie R.A., Irish J.M. Preparing Viable Single Cells from Human Tissue and Tumors for Cytomic Analysis // Current protocols in molecular biology. – 2017. – Vol. 118. – P. 25c.21.21-25c.21.23. doi:10.1002/cpmb.37.
- 229. Kim J.B. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology // Seminars in cancer biology. 2005. Vol. 15. P. 365-377. doi:10.1016/j.semcancer.2005.05.002.
- 230. Lin R.Z., Chang H.Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research // Biotechnology journal. 2008. Vol. 3. P. 1172-1184. doi:10.1002/biot.200700228.
- 231. Al Habyan S., Kalos C., Szymborski J., McCaffrey L. Multicellular detachment generates metastatic spheroids during intra-abdominal dissemination in epithelial ovarian cancer // Oncogene. – 2018. – Vol. 37. – P. 5127-5135. doi:10.1038/s41388-018-0317-x.
- 232. Balalaeva I.V., Sokolova E.A., Puzhikhina A.D., Brilkina A.A., Deyev S.M. Spheroids of HER2-Positive Breast Adenocarcinoma for Studying Anticancer Immunotoxins In Vitro // Acta naturae. – 2017. – Vol. 9. – P. 38-43.
- 233. Hjelstuen M.H., Rasch-Halvorsen K., Brekken C., Bruland O., de L.D.C. Penetration and binding of monoclonal antibody in human osteosarcoma multicell spheroids. Comparison of confocal laser scanning microscopy and autoradiography // Acta oncologica (Stockholm, Sweden). – 1996. – Vol. 35. – P. 273-279. doi:10.3109/02841869609101641.
- 234. Freyer J.P. Role of necrosis in regulating the growth saturation of multicellular spheroids // Cancer research. 1988. Vol. 48. P. 2432-2439.

- 235. Gewirtz D. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin // Biochemical Pharmacology. 1999. Vol. 57. P. 727-741. doi:https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00307-4.
- 236. van der Zanden S.Y., Qiao X., Neefjes J. New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin // The FEBS journal. 2021. Vol. 288. P. 6095-6111. doi:10.1111/febs.15583.
- 237. Sokolova E., Proshkina G., Kutova O., Shilova O., Ryabova A., Schulga A., Stremovskiy O., Zdobnova T., Balalaeva I., Deyev S. Recombinant targeted toxin based on HER2-specific DARPin possesses a strong selective cytotoxic effect in vitro and a potent antitumor activity in vivo // Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2016. Vol. 233. P. 48-56. doi:10.1016/j.jconrel.2016.05.020.
- 238. Shapira A., Benhar I. Toxin-based therapeutic approaches // Toxins. 2010. Vol. 2.
   P. 2519-2583. doi:10.3390/toxins2112519.
- 239. Chambers K.F., Mosaad E.M., Russell P.J., Clements J.A., Doran M.R. 3D Cultures of prostate cancer cells cultured in a novel high-throughput culture platform are more resistant to chemotherapeutics compared to cells cultured in monolayer // PloS one. – 2014. – Vol. 9. – P. e111029. doi:10.1371/journal.pone.0111029.
- 240. Sokolova E.A., Shilova O.N., Kiseleva D.V., Schulga A.A., Balalaeva I.V., Deyev S.M. HER2-Specific Targeted Toxin DARPin-LoPE: Immunogenicity and Antitumor Effect on Intraperitoneal Ovarian Cancer Xenograft Model // International journal of molecular sciences. 2019. Vol. 20. P. 2399.
- 241. Kijima T., Nakagawa H., Shimonosono M., Chandramouleeswaran P.M., Hara T., Sahu V., Kasagi Y., Kikuchi O., Tanaka K., Giroux V.; et al. Three-Dimensional Organoids Reveal Therapy Resistance of Esophageal and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma Cells // Cellular and molecular gastroenterology and hepatology. – 2019. – Vol. 7. – P. 73-91. doi:10.1016/j.jcmgh.2018.09.003.

- 242. Nowacka M., Sterzynska K., Andrzejewska M., Nowicki M., Januchowski R. Drug resistance evaluation in novel 3D in vitro model // Biomedicine & Pharmacotherapy. 2021. Vol. 138. P. 111536. doi:https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111536.
- 243. Akasov R., Zaytseva-Zotova D., Burov S., Leko M., Dontenwill M., Chiper M., Vandamme T., Markvicheva E. Formation of multicellular tumor spheroids induced by cyclic RGD-peptides and use for anticancer drug testing in vitro // International journal of pharmaceutics. – 2016. – Vol. 506. – P. 148-157. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.04.005.
- 244. Zhao Y., Onda K., Yuan B., Tanaka S., Kiyomi A., Sugiyama K., Sugiura M., Takagi N., Hirano T. Arsenic disulfide-induced apoptosis and its potential mechanism in two- and three-dimensionally cultured human breast cancer MCF-7 cells // International journal of oncology. – 2018. – Vol. 52. – P. 1959-1971. doi:10.3892/ijo.2018.4357.
- 245. Bingel C., Koeneke E., Ridinger J., Bittmann A., Sill M., Peterziel H., Wrobel J.K., Rettig I., Milde T., Fernekorn U.; et al. Three-dimensional tumor cell growth stimulates autophagic flux and recapitulates chemotherapy resistance // Cell Death & Disease. – 2017. – Vol. 8. – P. e3013-e3013. doi:10.1038/cddis.2017.398.
- 246. Durbin K.R., Nottoli M.S., Jenkins G.J. Effects of microtubule-inhibiting small molecule and antibody-drug conjugate treatment on differentially-sized A431 squamous carcinoma spheroids // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10. – P. 907. doi:10.1038/s41598-020-57789-y.
- 247. Cavaco M., Fraga P., Valle J., Andreu D., Castanho M.A.R.B., Neves V. Development of Breast Cancer Spheroids to Evaluate Cytotoxic Response to an Anticancer Peptide // Pharmaceutics. – 2021. – Vol. 13. – P. 1863.
- 248. Phung Y.T., Barbone D., Broaddus V.C., Ho M. Rapid generation of in vitro multicellular spheroids for the study of monoclonal antibody therapy // Journal of Cancer. – 2011. – Vol. 2. – P. 507-514. doi:10.7150/jca.2.507.

- 249. Boyer J.Z., Phillips G.D.L., Nitta H., Garsha K., Admire B., Kraft R., Dennis E., Vela E., Towne P. Activity of trastuzumab emtansine (T-DM1) in 3D cell culture // Breast cancer research and treatment. 2021. Vol. 188. P. 65-75. doi:10.1007/s10549-021-06272-x.
- 250. Shipunova V.O., Kovalenko V.L., Kotelnikova P.A., Sogomonyan A.S., Shilova O.N., Komedchikova E.N., Zvyagin A.V., Nikitin M.P., Deyev S.M. Targeting Cancer Cell Tight Junctions Enhances PLGA-Based Photothermal Sensitizers' Performance In Vitro and In Vivo // Pharmaceutics. 2021. Vol. 14. P. 43. doi:10.3390/pharmaceutics14010043.
- 251. Dewhirst M.W., Secomb T.W. Transport of drugs from blood vessels to tumour tissue // Nature reviews. Cancer. 2017. Vol. 17. P. 738-750. doi:10.1038/nrc.2017.93.
- 252. Böckelmann L.C., Schumacher U. Targeting tumor interstitial fluid pressure: will it yield novel successful therapies for solid tumors? // Expert opinion on therapeutic targets. – 2019. – Vol. 23. – P. 1005-1014. doi:10.1080/14728222.2019.1702974.
- 253. LaBonia G.J., Lockwood S.Y., Heller A.A., Spence D.M., Hummon A.B. Drug penetration and metabolism in 3D cell cultures treated in a 3D printed fluidic device: assessment of irinotecan via MALDI imaging mass spectrometry // Proteomics. 2016. Vol. 16. P. 1814-1821. doi:10.1002/pmic.201500524.
- 254. Nunes A.S., Barros A.S., Costa E.C., Moreira A.F., Correia I.J. 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs // Biotechnology and bioengineering. – 2019. – Vol. 116. – P. 206-226. doi:10.1002/bit.26845.
- 255. Swietach P., Hulikova A., Patiar S., Vaughan-Jones R.D., Harris A.L. Importance of intracellular pH in determining the uptake and efficacy of the weakly basic chemotherapeutic drug, doxorubicin // PloS one. – 2012. – Vol. 7. – P. e35949. doi:10.1371/journal.pone.0035949.

- 256. Fujimori K., Covell D.G., Fletcher J.E., Weinstein J.N. A modeling analysis of monoclonal antibody percolation through tumors: a binding-site barrier // Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine. – 1990. – Vol. 31. – P. 1191-1198.
- 257. Adams G.P., Schier R., McCall A.M., Simmons H.H., Horak E.M., Alpaugh R.K., Marks J.D., Weiner L.M. High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules // Cancer research. – 2001. – Vol. 61. – P. 4750-4755.
- 258. Leblond F., Davis S.C., Valdés P.A., Pogue B.W. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications // Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology. – 2010. – Vol. 98. – P. 77-94. doi:10.1016/j.jphotobiol.2009.11.007.
- 259. Winner K.K., Steinkamp M.P., Lee R.J., Swat M., Muller C.Y., Moses M.E., Jiang Y., Wilson B.S. Spatial Modeling of Drug Delivery Routes for Treatment of Disseminated Ovarian Cancer // Cancer research. 2016. Vol. 76. P. 1320-1334. doi:10.1158/0008-5472.can-15-1620.
- 260. van den Brand D., Veelken C., Massuger L., Brock R. Penetration in 3D tumor spheroids and explants: Adding a further dimension to the structure-activity relationship of cell-penetrating peptides // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes. 2018. Vol. 1860. P. 1342-1349. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.03.007.
- 261. Lee H.R., Kim D.W., Jones V.O., Choi Y., Ferry V.E., Geller M.A., Azarin S.M. Sonosensitizer-Functionalized Graphene Nanoribbons for Adhesion Blocking and Sonodynamic Ablation of Ovarian Cancer Spheroids // Advanced healthcare materials. – 2021. – Vol. 10. – P. e2001368. doi:10.1002/adhm.202001368.
- 262. Wang J., Mao W., Lock L.L., Tang J., Sui M., Sun W., Cui H., Xu D., Shen Y. The Role of Micelle Size in Tumor Accumulation, Penetration, and Treatment // ACS nano. – 2015. – Vol. 9. – P. 7195-7206. doi:10.1021/acsnano.5b02017.

- 263. Cabral H., Matsumoto Y., Mizuno K., Chen Q., Murakami M., Kimura M., Terada Y., Kano M.R., Miyazono K., Uesaka M.; et al. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size // Nature nanotechnology. 2011. Vol. 6. P. 815-823. doi:10.1038/nnano.2011.166.
- 264. Lee H., Fonge H., Hoang B., Reilly R.M., Allen C. The effects of particle size and molecular targeting on the intratumoral and subcellular distribution of polymeric nanoparticles // Molecular pharmaceutics. – 2010. – Vol. 7. – P. 1195-1208. doi:10.1021/mp100038h.
- 265. Primeau A.J., Rendon A., Hedley D., Lilge L., Tannock I.F. The distribution of the anticancer drug Doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors // Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2005. Vol. 11. P. 8782-8788. doi:10.1158/1078-0432.ccr-05-1664.
- 266. Namazi H., Kulish V.V., Wong A., Nazeri S. Mathematical Based Calculation of Drug Penetration Depth in Solid Tumors // BioMed research international. – 2016. – Vol. 2016. – P. 8437247. doi:10.1155/2016/8437247.
- 267. Oh D.Y., Bang Y.J. HER2-targeted therapies a role beyond breast cancer // Nature reviews. Clinical oncology. 2020. Vol. 17. P. 33-48. doi:10.1038/s41571-019-0268-3.
- 268. Nami B., Ghanaeian A., Wang Z. Epigenetic downregulation of HER2 during EMT leads to tumor resistance to HER2-targeted therapies in breast cancer // bioRxiv. – 2020. – Vol. – P. 2020.2003.2024.006379. doi:10.1101/2020.03.24.006379.
- 269. Natali P.G., Nicotra M.R., Bigotti A., Venturo I., Slamon D.J., Fendly B.M., Ullrich A. Expression of the p185 encoded by HER2 oncogene in normal and transformed human tissues // International journal of cancer. 1990. Vol. 45. P. 457-461. doi:10.1002/ijc.2910450314.
- 270. Pickl M., Ries C.H. Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab // Oncogene. – 2009. – Vol. 28. – P. 461-468. doi:10.1038/onc.2008.394.

- 271. Howes A.L., Richardson R.D., Finlay D., Vuori K. 3-Dimensional culture systems for anti-cancer compound profiling and high-throughput screening reveal increases in EGFR inhibitor-mediated cytotoxicity compared to monolayer culture systems // PloS one. – 2014. – Vol. 9. – P. e108283. doi:10.1371/journal.pone.0108283.
- 272. Nagata Y., Lan K.H., Zhou X., Tan M., Esteva F.J., Sahin A.A., Klos K.S., Li P., Monia B.P., Nguyen N.T.; et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients // Cancer cell. – 2004. – Vol. 6. – P. 117-127. doi:10.1016/j.ccr.2004.06.022.
- 273. Chandarlapaty S., Sakr R.A., Giri D., Patil S., Heguy A., Morrow M., Modi S., Norton L., Rosen N., Hudis C.; et al. Frequent mutational activation of the PI3K-AKT pathway in trastuzumab-resistant breast cancer // Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2012. Vol. 18. P. 6784-6791. doi:10.1158/1078-0432.ccr-12-1785.
- 274. Phillips G.D., Fields C.T., Li G., Dowbenko D., Schaefer G., Miller K., Andre F., Burris H.A., 3rd, Albain K.S., Harbeck N.; et al. Dual targeting of HER2-positive cancer with trastuzumab emtansine and pertuzumab: critical role for neuregulin blockade in antitumor response to combination therapy // Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. – 2014. – Vol. 20. – P. 456-468. doi:10.1158/1078-0432.ccr-13-0358.
- 275. Nahta R., Yuan L.X., Zhang B., Kobayashi R., Esteva F.J. Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells // Cancer research. – 2005. – Vol. 65. – P. 11118-11128. doi:10.1158/0008-5472.can-04-3841.
- 276. Hutcheson I., Barrow D., Hasmann M., Nicholson R. Induction of erbB3/EGFR heterodimers mediates resistance to pertuzumab in a tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cell line // Molecular Cancer Therapeutics. – 2007. – Vol. 6. – P. A118-A118.

- 277. Xia W., Bacus S., Hegde P., Husain I., Strum J., Liu L., Paulazzo G., Lyass L., Trusk P., Hill J.; et al. A model of acquired autoresistance to a potent ErbB2 tyrosine kinase inhibitor and a therapeutic strategy to prevent its onset in breast cancer // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2006. – Vol. 103. – P. 7795-7800. doi:10.1073/pnas.0602468103.
- 278. Shattuck D.L., Miller J.K., Carraway K.L., 3rd, Sweeney C. Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells // Cancer research. – 2008. – Vol. 68. – P. 1471-1477. doi:10.1158/0008-5472.can-07-5962.
- 279. Wang W., Gao Y., Hai J., Yang J., Duan S. HER2 decreases drug sensitivity of ovarian cancer cells via inducing stem cell-like property in an NFκB-dependent way // Bioscience reports. – 2019. – Vol. 39. – P. doi:10.1042/bsr20180829.
- 280. Kang H.J., Yi Y.W., Hong Y.B., Kim H.J., Jang Y.J., Seong Y.S., Bae I. HER2 confers drug resistance of human breast cancer cells through activation of NRF2 by direct interaction // Sci Rep. – 2014. – Vol. 4. – P. 7201. doi:10.1038/srep07201.
- 281. Sonnenschein C., Soto A.M. Over a century of cancer research: Inconvenient truths and promising leads // PLoS biology. – 2020. – Vol. 18. – P. e3000670. doi:10.1371/journal.pbio.3000670.
- 282. Koensgen D., Freitag C., Klaman I., Dahl E., Mustea A., Chekerov R., Braicu I., Lichtenegger W., Sehouli J. Expression and localization of e-cadherin in epithelial ovarian cancer // Anticancer research. – 2010. – Vol. 30. – P. 2525-2530.
- 283. Pakuła M., Mikuła-Pietrasik J., Witucka A., Kostka-Jeziorny K., Uruski P., Moszyński R., Naumowicz E., Sajdak S., Tykarski A., Książek K. The epithelialmesenchymal transition initiated by malignant ascites underlies the transmesothelial invasion of ovarian cancer cells // International journal of molecular sciences. – 2019. – Vol. 20. – P. 137.

- 284. Veatch A.L., Carson L.F., Ramakrishnan S. Differential expression of the cell cell adhesion molecule E - cadherin in ascites and solid human ovarian tumor cells // International journal of cancer. – 1994. – Vol. 58. – P. 393-399.
- 285. Jacob F., Alam S., Konantz M., Liang C.Y., Kohler R.S., Everest-Dass A.V., Huang Y.L., Rimmer N., Fedier A., Schötzau A.; et al. Transition of Mesenchymal and Epithelial Cancer Cells Depends on α1-4 Galactosyltransferase-Mediated Glycosphingolipids // Cancer research. – 2018. – Vol. 78. – P. 2952-2965. doi:10.1158/0008-5472.can-17-2223.
- 286. Kim B., Im N.R., Yang T.D., Kim J., Jung K.Y., Kim T.H., Baek S.K. Enhancement of aberrantly modified integrin-mediated cell motility in multicellular tumor spheroids // International journal of oncology. – 2020. – Vol. 56. – P. 1490-1498. doi:10.3892/ijo.2020.5016.
- 287. Song H., Cai G.H., Liang J., Ao D.S., Wang H., Yang Z.H. Three-dimensional culture and clinical drug responses of a highly metastatic human ovarian cancer HO-8910PM cells in nanofibrous microenvironments of three hydrogel biomaterials // Journal of nanobiotechnology. 2020. Vol. 18. P. 90. doi:10.1186/s12951-020-00646-x.
- 288. Xu S., Yang Y.n., Dong L., Qiu W., Yang L., Wang X., Liu L. Construction and characteristics of an E-cadherin-related three-dimensional suspension growth model of ovarian cancer // Scientific reports. – 2014. – Vol. 4. – P. 1-8.
- 289. Svirshchevskaya E., Doronina E., Grechikhina M., Matushevskaya E., Kotsareva O., Fattakhova G., Sapozhnikov A., Felix K. Characteristics of multicellular tumor spheroids formed by pancreatic cells expressing different adhesion molecules // Life Sciences. 2019. Vol. 219. P. 343-352. doi:https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.01.034.
- 290. Xie C., Ji N., Tang Z., Li J., Chen Q. The role of extracellular vesicles from different origin in the microenvironment of head and neck cancers // Molecular Cancer. 2019. Vol. 18. P. 83. doi:10.1186/s12943-019-0985-3.

- 291. McLachlan E., Shao Q., Wang H.L., Langlois S., Laird D.W. Connexins act as tumor suppressors in three-dimensional mammary cell organoids by regulating differentiation and angiogenesis // Cancer research. – 2006. – Vol. 66. – P. 9886-9894. doi:10.1158/0008-5472.can-05-4302.
- 292. Wang W.K., Chen M.C., Leong H.F., Kuo Y.L., Kuo C.Y., Lee C.H. Connexin 43 suppresses tumor angiogenesis by down-regulation of vascular endothelial growth factor via hypoxic-induced factor-1α // International journal of molecular sciences. 2014. Vol. 16. P. 439-451. doi:10.3390/ijms16010439.
- 293. Hofmann F., Navarrete M., Álvarez J., Guerrero I., Gleisner M.A., Tittarelli A., Salazar-Onfray F. Cx43-Gap Junctions Accumulate at the Cytotoxic Immunological Synapse Enabling Cytotoxic T Lymphocyte Melanoma Cell Killing // International journal of molecular sciences. – 2019. – Vol. 20. – P. doi:10.3390/ijms20184509.
- 294. Tittarelli A., Navarrete M., Gleisner M.A., Gebicke-Haerter P., Salazar-Onfray F. Connexin-Mediated Signaling at the Immunological Synapse // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol. 21. – P. doi:10.3390/ijms21103736.
- 295. Sirnes S., Honne H., Ahmed D., Danielsen S.A., Rognum T.O., Meling G.I., Leithe E., Rivedal E., Lothe R.A., Lind G.E. DNA methylation analyses of the connexin gene family reveal silencing of GJC1 (Connexin45) by promoter hypermethylation in colorectal cancer // Epigenetics. 2011. Vol. 6. P. 602-609. doi:10.4161/epi.6.5.15237.
- 296. Fostok S., El-Sibai M., Bazzoun D., Lelièvre S., Talhouk R. Connexin 43 Loss Triggers Cell Cycle Entry and Invasion in Non-Neoplastic Breast Epithelium: A Role for Noncanonical Wnt Signaling // Cancers. – 2019. – Vol. 11. – P. 339.
- 297. Darr E.A., Patel A.D., Yu G., Komorowski Z., McCormick S., Tiwari R., Schantz S.P., Geliebter J. Reduced Cx43 Gap Junction Plaque Expression Differentiates Thyroid Carcinomas From Benign Disease // Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery. 2011. Vol. 137. P. 1161-1165. doi:10.1001/archoto.2011.186.

- 298. Eguchi H., Akizuki R., Maruhashi R., Tsukimoto M., Furuta T., Matsunaga T., Endo S., Ikari A. Increase in resistance to anticancer drugs involves occludin in spheroid culture model of lung adenocarcinoma A549 cells // Sci Rep. 2018. Vol. 8. P. 15157. doi:10.1038/s41598-018-33566-w.
- 299. Lee S.-Y., Teng Y., Son M., Ku B., Hwang H.J., Tergaonkar V., Chow P.K.-H., Lee D.W., Nam D.-H. Three-Dimensional Aggregated Spheroid Model of Hepatocellular Carcinoma Using a 96-Pillar/Well Plate // Molecules. 2021. Vol. 26. P. 4949. doi:10.3390/molecules26164949.
- 300. Hoevel T., Macek R., Swisshelm K., Kubbies M. Reexpression of the TJ protein CLDN1 induces apoptosis in breast tumor spheroids // International journal of cancer. – 2004. – Vol. 108. – P. 374-383. doi:https://doi.org/10.1002/ijc.11571.
- 301. Ni S., Xu L., Huang J., Feng J., Zhu H., Wang G., Wang X. Increased ZO-1 expression predicts valuable prognosis in non-small cell lung cancer // International journal of clinical and experimental pathology. – 2013. – Vol. 6. – P. 2887-2895.
- 302. Liu L., Dong W., Wang S., Zhang Y., Liu T., Xie R., Wang B., Cao H. Deoxycholic acid disrupts the intestinal mucosal barrier and promotes intestinal tumorigenesis // Food & function. 2018. Vol. 9. P. 5588-5597. doi:10.1039/c8fo01143e.
- 303. Zhang X., Wang L., Zhang H., Tu F., Qiang Y., Nie C. Decreased expression of ZO-1 is associated with tumor metastases in liver cancer // Oncology letters. – 2019. – Vol. 17. – P. 1859-1864. doi:10.3892/ol.2018.9765.
- 304. Neyrinck-Leglantier D., Lesage J., Blacher S., Bonnomet A., Hunziker W., Noël A., Dormoy V., Nawrocki-Raby B., Gilles C., Polette M. ZO-1 Intracellular Localization Organizes Immune Response in Non-Small Cell Lung Cancer // Frontiers in cell and developmental biology. – 2021. – Vol. 9. – P. doi:10.3389/fcell.2021.749364.
- 305. Yamamoto D., Kayamori K., Sakamoto K., Tsuchiya M., Ikeda T., Harada H., Yoda T., Watabe T., Hara-Yokoyama M. Intracellular claudin-1 at the invasive front of

tongue squamous cell carcinoma is associated with lymph node metastasis // Cancer science. – 2020. – Vol. 111. – P. 700-712. doi:10.1111/cas.14249.

- 306. Iikawa N., Yamamoto Y., Kawasaki Y., Nishijima-Matsunobu A., Suzuki M., Yamada T., Omori Y. Intrinsic Oncogenic Function of Intracellular Connexin26 Protein in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells // International journal of molecular sciences. – 2018. – Vol. 19. – P. 2134. doi:10.3390/ijms19072134.
- 307. Zeng S.G., Lin X., Liu J.C., Zhou J. Hypoxia-induced internalization of connexin 26 and connexin 43 in pulmonary epithelial cells is involved in the occurrence of non-small cell lung cancer via the P53/MDM2 signaling pathway // International journal of oncology. – 2019. – Vol. 55. – P. 845-859. doi:10.3892/ijo.2019.4867.
- 308. Kotini M., Barriga E.H., Leslie J., Gentzel M., Rauschenberger V., Schambony A., Mayor R. Gap junction protein Connexin-43 is a direct transcriptional regulator of N-cadherin in vivo // Nat Commun. – 2018. – Vol. 9. – P. 3846. doi:10.1038/s41467-018-06368-x.
- 309. Govindarajan R., Chakraborty S., Johnson K.E., Falk M.M., Wheelock M.J., Johnson K.R., Mehta P.P. Assembly of connexin43 into gap junctions is regulated differentially by E-cadherin and N-cadherin in rat liver epithelial cells // Molecular biology of the cell. – 2010. – Vol. 21. – P. 4089-4107. doi:10.1091/mbc.E10-05-0403.
- 310. Luo H., Wang X., Ge H., Zheng N., Peng F., Fu Y., Tao L., Wang Q. Inhibition of ubiquitin-specific protease 14 promotes connexin 32 internalization and counteracts cisplatin cytotoxicity in human ovarian cancer cells // Oncology reports. – 2019. – Vol. 42. – P. 1237-1247. doi:10.3892/or.2019.7232.
- 311. Ning Y., Luo C., Ren K., Quan M., Cao J. FOXO3a-mediated suppression of the self-renewal capacity of sphere-forming cells derived from the ovarian cancer SKOV3 cell line by 7-difluoromethoxyl-5,4'-di-n-octyl genistein // Molecular medicine reports. – 2014. – Vol. 9. – P. 1982-1988. doi:10.3892/mmr.2014.2012.

- 312. Roy L., Bobbs A., Sattler R., Kurkewich J.L., Dausinas P.B., Nallathamby P., Cowden Dahl K.D. CD133 Promotes Adhesion to the Ovarian Cancer Metastatic Niche // Cancer growth and metastasis. – 2018. – Vol. 11. – P. 1179064418767882. doi:10.1177/1179064418767882.
- 313. Massazza G., Tomasoni A., Lucchini V., Allavena P., Erba E., Colombo N., Mantovani A., D'Incalci M., Mangioni C., Giavazzi R. Intraperitoneal and subcutaneous xenografts of human ovarian carcinoma in nude mice and their potential in experimental therapy // International journal of cancer. – 1989. – Vol. 44. – P. 494-500. doi:10.1002/ijc.2910440320.
- 314. Jun E., Hong S.M., Yoo H.J., Kim M.B., Won J.S., An S., Shim I.K., Chang S., Hoffman R.M., Kim S.C. Genetic and metabolic comparison of orthotopic and heterotopic patient-derived pancreatic-cancer xenografts to the original patient tumors // Oncotarget. – 2018. – Vol. 9. – P. 7867-7881. doi:10.18632/oncotarget.23567.
- 315. Deng K., Yang C., Tan Q., Song W., Lu M., Zhao W., Lou G., Li Z., Li K., Hou Y. Sites of distant metastases and overall survival in ovarian cancer: A study of 1481 patients // Gynecologic oncology. 2018. Vol. 150. P. 460-465. doi:10.1016/j.ygyno.2018.06.022.
- 316. Komen J., van Neerven S.M., van den Berg A., Vermeulen L., van der Meer A.D. Mimicking and surpassing the xenograft model with cancer-on-chip technology // EBioMedicine. 2021. Vol. 66. P. 103303. doi:10.1016/j.ebiom.2021.103303.
- 317. Burgess L.J. Biochemical analysis of pleural, peritoneal and pericardial effusions // Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. – 2004. – Vol. 343. – P. 61-84. doi:10.1016/j.cccn.2004.02.002.
- 318. Qin Z., Fang D., Fang Y. Low expression of occludin: a predictor of poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma // International journal of clinical and experimental pathology. – 2017. – Vol. 10. – P. 7451-7459.

- 319. Gonzalez M.A., Pinder S.E., Wencyk P.M., Bell J.A., Elston C.W., Nicholson R.I., Robertson J.F., Blamey R.W., Ellis I.O. An immunohistochemical examination of the expression of E-cadherin, alpha- and beta/gamma-catenins, and alpha2- and beta1-integrins in invasive breast cancer // The Journal of pathology. 1999. Vol. 187. P. 523-529. doi:10.1002/(sici)1096-9896(199904)187:5<523::aid-path296>3.0.co;2-3.
- 320. Strouhalova K., Přechová M., Gandalovičová A., Brábek J., Gregor M., Rosel D. Vimentin Intermediate Filaments as Potential Target for Cancer Treatment // Cancers. – 2020. – Vol. 12. – P. doi:10.3390/cancers12010184.
- 321. Xuan B., Ghosh D., Jiang J., Shao R., Dawson M.R. Vimentin filaments drive migratory persistence in polyploidal cancer cells // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2020. – Vol. 117. – P. 26756-26765. doi:10.1073/pnas.2011912117.
- 322. Hum N.R., Sebastian A., Gilmore S.F., He W., Martin K.A., Hinckley A., Dubbin K.R., Moya M.L., Wheeler E.K., Coleman M.A.; et al. Comparative Molecular Analysis of Cancer Behavior Cultured In Vitro, In Vivo, and Ex Vivo // Cancers. 2020. Vol. 12. P. 690.
- 323. Velletri T., Villa C.E., Cilli D., Barzaghi B., Lo Riso P., Lupia M., Luongo R., López-Tobón A., De Simone M., Bonnal R.J.P.; et al. Single cell-derived spheroids capture the self-renewing subpopulations of metastatic ovarian cancer // Cell death and differentiation. 2022. Vol. 29. P. 614-626. doi:10.1038/s41418-021-00878-W.
- 324. Fu J. Cx43 expressed on bone marrow stromal cells plays an essential role in multiple myeloma cell survival and drug resistance // Archives of medical science : AMS. – 2017. – Vol. 13. – P. 236-245. doi:10.5114/aoms.2017.64722.
- 325. Lin Q., Balasubramanian K., Fan D., Kim S.J., Guo L., Wang H., Bar-Eli M., Aldape K.D., Fidler I.J. Reactive astrocytes protect melanoma cells from chemotherapy by sequestering intracellular calcium through gap junction

communication channels // Neoplasia. – 2010. – Vol. 12. – P. 748-754. doi:10.1593/neo.10602.

- 326. Su M., Zhang Q. Deficiency of gap junction composed of connexin43 contributes to oxaliplatin resistance in colon cancer cells // Oncology letters. – 2017. – Vol. 14. – P. 3669-3674. doi:10.3892/ol.2017.6598.
- 327. Kataoka Y., Mukohara T., Shimada H., Saijo N., Hirai M., Minami H. Association between gain-of-function mutations in PIK3CA and resistance to HER2-targeted agents in HER2-amplified breast cancer cell lines // Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology. – 2010. – Vol. 21. – P. 255-262. doi:10.1093/annonc/mdp304.
- 328. Casey R.C., Burleson K.M., Skubitz K.M., Pambuccian S.E., Oegema T.R., Jr., Ruff L.E., Skubitz A.P. Beta 1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids // The American journal of pathology. 2001. Vol. 159. P. 2071-2080. doi:10.1016/s0002-9440(10)63058-1.
- 329. Sodek K.L., Ringuette M.J., Brown T.J. Compact spheroid formation by ovarian cancer cells is associated with contractile behavior and an invasive phenotype // International journal of cancer. – 2009. – Vol. 124. – P. 2060-2070. doi:10.1002/ijc.24188.
- 330. Lee A.F., Chen M.C., Chen C.J., Yang C.J., Huang M.S., Liu Y.P. Reverse epithelial-mesenchymal transition contributes to the regain of drug sensitivity in tyrosine kinase inhibitor-resistant non-small cell lung cancer cells // PloS one. – 2017. – Vol. 12. – P. e0180383. doi:10.1371/journal.pone.0180383.
- 331. Saxena M., Stephens M.A., Pathak H., Rangarajan A. Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters // Cell Death Dis. – 2011. – Vol. 2. – P. e179. doi:10.1038/cddis.2011.61.
- 332. Ghiso E., Migliore C., Ciciriello V., Morando E., Petrelli A., Corso S., De Luca E., Gatti G., Volante M., Giordano S. YAP-Dependent AXL Overexpression Mediates

Resistance to EGFR Inhibitors in NSCLC // Neoplasia. – 2017. – Vol. 19. – P. 1012-1021. doi:10.1016/j.neo.2017.10.003.

- 333. Taube J.H., Herschkowitz J.I., Komurov K., Zhou A.Y., Gupta S., Yang J., Hartwell K., Onder T.T., Gupta P.B., Evans K.W.; et al. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010. Vol. 107. P. 15449-15454. doi:10.1073/pnas.1004900107.
- 334. Phi L.T.H., Sari I.N., Yang Y.G., Lee S.H., Jun N., Kim K.S., Lee Y.K., Kwon H.Y. Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment // Stem cells international. 2018. Vol. 2018. P. 5416923. doi:10.1155/2018/5416923.
- 335. Sha Y., Haensel D., Gutierrez G., Du H., Dai X., Nie Q. Intermediate cell states in epithelial-to-mesenchymal transition // Physical biology. – 2019. – Vol. 16. – P. 021001. doi:10.1088/1478-3975/aaf928.
- 336. Rosso M., Majem B., Devis L., Lapyckyj L., Besso M.J., Llauradó M., Abascal M.F., Matos M.L., Lanau L., Castellví J.; et al. E-cadherin: A determinant molecule associated with ovarian cancer progression, dissemination and aggressiveness // PloS one. – 2017. – Vol. 12. – P. e0184439. doi:10.1371/journal.pone.0184439.
- 337. Teng L., Peng S., Guo H., Liang H., Xu Z., Su Y., Gao L. Conditioned media from human ovarian cancer endothelial progenitor cells induces ovarian cancer cell migration by activating epithelial-to-mesenchymal transition // Cancer gene therapy. - 2015. – Vol. 22. – P. 518-523. doi:10.1038/cgt.2015.45.
- 338. Klymenko Y., Johnson J., Bos B., Lombard R., Campbell L., Loughran E., Stack M.S. Heterogeneous Cadherin Expression and Multicellular Aggregate Dynamics in Ovarian Cancer Dissemination // Neoplasia. – 2017. – Vol. 19. – P. 549-563. doi:10.1016/j.neo.2017.04.002.