

УДК 576.3: 576.08:616-006

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ pRb И бета-КАТЕНИНА В ОПУХОЛЕВОЙ И НОРМАЛЬНОЙ ТКАНИ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. В. М. Рябов¹, Н. И. Тяпкин², А. П. Родимцев¹, О. Г. Люблинская¹,
И. В. Гужова¹, Б. В. Попов^{1, *}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

² Ленинградский региональный клинический онкологический диспансер им. Л.Д. Романа
Минздрава России, Кузьмолово, 188663, Россия

* E-mail: voldemryabov@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.07.2023 г.

После доработки 22.08.2023 г.

Принята к публикации 08.09.2023 г.

Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из самых распространенных онкологических заболеваний, которое в своем развитии проходит две стадии: локализованный РПЖ и кастрационно-резистентный РПЖ (КР-РПЖ). Первая стадия — локализованный РПЖ — может неопределенно долго протекать в дремлющей форме, не требующей активного медицинского вмешательства, или неожиданно переходить в агрессивную метастатическую форму (КР-РПЖ), заканчивающуюся быстрым летальным исходом. Патогенез перехода дремлющей формы РПЖ в метастатическую форму остается не полностью изученным. Сигнальные пути опухолевого супрессора pRb и протоонкогена β-катенина являются, вероятно, наиболее вовлеченными в патогенез РПЖ, однако роль их взаимодействия не исследована. Изучение патогенеза опухолей других тканей позволяет предположить, что в начальной стадии развития РПЖ pRb теряет некоторые свойства опухолевого супрессора, что может происходить при его взаимодействии с β-катенином и дает возможность опухолевым клеткам получить конкурентные преимущества для размножения. В нашей работе мы показали, что гены *RB* и β-катенина (*CTNNB1*) экспрессируются в опухолевой и нормальной ткани предстательной железы (ПЖ). В отличие от β-катенина, pRb не выявляется в иммуноблотинге в опухолевой и нормальной ткани ПЖ, но легко определяется таким способом в экстрактах контрольных клеток линии T98G. С одной стороны, ко-иммунопреципитация антителами к pRb из экстрактов опухолевой и нормальной ткани ПЖ дает возможность выявить этот белок и β-катенин последующим иммуноблотингом, что свидетельствует о физическом взаимодействии названных белков в ткани ПЖ. С другой стороны, иммунопреципитация β-катенина антителами к его С-концевому фрагменту не дает возможности выявить этот белок в экстрактах ПЖ последующим иммуноблотингом с помощью тех же антител. В противоположность ткани ПЖ, β-катенин легко определяется в иммунопреципитации, совмещенной с иммуноблотингом, в экстрактах контрольных клеток T98G. Полученные данные дают возможность предположить, что *RB* и β-катенин физически взаимодействуют друг с другом в клетках различной тканевой специфичности. В клетках линии T98G такое взаимодействие происходит, вероятно, через С-концевой фрагмент β-катенина, но в клетках ПЖ оно осуществляется другим путем, поскольку С-фрагмент β-катенина оказывается экранированным от такого взаимодействия, возможно из-за его физической ассоциации с pRb.

Ключевые слова: локализованный рак предстательной железы, сигнальные пути, pRb, β-катенин, взаимодействие

Принятые сокращения: КР-РПЖ — кастрационно-резистентный РПЖ, ПЖ — предстательная железа, ПСА — простатический специфический антиген, ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, РПЖ — рак предстательной железы, ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в реальном времени, AR — андрогенный рецептор, CTNNB1 — ген β-катенина, передающего сигналы в каноническом сигнальном пути Wnt/β-катенин, *RB* — ген чувствительности к ретинобластоме; pRb — продукт гена *RB*.

DOI: 10.31857/S0041377124010067, EDN: IBXASX

Ген *RB*, определяющий чувствительность к возникновению ретинобластомы, был первым опухолевым супрессором, который удалось клонировать в 1986–1987 гг. (Friend et al., 1986; Lee et al., 1987).

С тех пор *RB* и его продукт pRb постепенно заняли центральное место в публикациях, посвященных изучению основных клеточных функций и их нарушений при онкологических заболеваниях.

Область регуляторной активности *RB* включает эмбриональные стволовые, соматические стволовые и дифференцированные клетки различных тканей (Sage, 2012). Онкосупрессорная активность pRb основана на его канонической роли в регуляции клеточного цикла и неканонической роли в регуляции состояния хроматина (Weinberg, 1995; Sherr, 1996; Dyson, 1998; Dick et al., 2018).

Многофункциональность pRb опосредована его свойством взаимодействовать со множеством различных регуляторных белков. Основными партнерами pRb являются транскрипционные факторы семейства E2F, которые опосредуют его регуляторное воздействие на клеточный цикл и хроматин (Dyson, 1998). В ходе такого взаимодействия белки семейства E2F, имеющие сайты связывания в промоторах множества генов, физически взаимодействуют с pRb, способствуют формированию комплекса pRb-E2F на промоторах генов-мишеней и прямому или опосредованному торможению их транскрипции путем рекрутирования комплексов или отдельных белков, например метилтрансферазы Ezh2. Ezh2 триметирует лизин 27 гистона H3 (H3K27me3). Такая модификация хроматина в промоторах генов плюрипотентности *OCT4*, *SOX2* в эксперименте вызывает их сайленсинг, сохраняющий стволовые клетки в состоянии самоподдержания и тормозящий их дифференцировку в тканеспецифические специализированные клетки (Kareta et al., 2015; Dick et al., 2018). Потеря, мутации, метилирование промотора *RB* или посттрансляционные модификации его продукта ведут к изменениям внутриклеточной сигнализации и возникновению опухолей в различных тканях, включая предстательную железу (ПЖ) (Mandigo et al., 2021).

В мужской репродуктивной системе ПЖ является небольшим вспомогательным органом, который в настоящее время находится в центре биомедицинских исследований вследствие самой высокой чувствительности к онкогенной трансформации среди других органов у мужчин.

Рак предстательной железы (РПЖ) диагностируется в течение жизни у каждого восьмого лица мужского пола (Siegel et al., 2021). ПЖ формируется и функционирует в эмбриональной жизни и после рождения под контролем сигнального пути андрогенного рецептора (AR) (Cunha, 1994). AR наиболее высоко экспрессируется в люминальном эпителии ПЖ, фенотип которого доминирует при РПЖ, поэтому AR является критическим фактором возникновения и прогрессии РПЖ и эффективности его терапии (Balk, Knudsen, 2008).

С одной стороны, *AR* способствует делению клетки путем индукции экспрессии циклина D1, образованию активной киназы циклин-D/Cdk4,6 и последующей инактивации pRb путем его гиперфосфорилирования (Xu et al., 2006). pRb является убиквитарным негативным регулятором клеточного цикла. В начале фазы G1 он находится в гипофосфорилированном активном состоянии и индуцирует остановку клеточного цикла в рестрикционной точке R1 перед началом репликации ДНК путем связывания и секвестрирования активаторных транскрипционных факторов E2Fs (E2F1-E2F3). Фосфорилирование pRb киназами циклин-D/Cdk4,6 и циклин-E/Cdk2 освобождает белки E2Fs от связи с ним.

В несвязанном с pRb состоянии белки E2Fs способствуют последовательному формированию циклин-зависимых киназных комплексов, включающих циклины D, E, A, M. Такие комплексы создают механизм последовательного прохождения клеткой фаз G1, S, G2/M клеточного цикла (Dyson, 1988; Рябов и др., 2022).

С другой стороны, проксимальный и дистальный промоторы гена *AR* содержат сайты связывания белков E2Fs, передающих регуляторное влияние pRb на транскрипцию *AR*. Сигнальный путь pRb-E2F1 транскрипционно тормозит экспрессию *AR* и его мишеней – генов ПСА и сериновой трансмембранной протеазы (TMPRSS2). При потере *RB* происходит активация сигнального пути *AR* и связанное с ним повышение уровня продуктов ПСА и *TMPRSS2*. Ген *TMPRSS2* у части пациентов с РПЖ формирует рекомбинантную последовательность путем слияния с геном *ERG* (*TMPRSS2-ERG*), которая является маркером РПЖ (Tomlins et al., 2008).

Утрата *RB* играет ключевую роль в патогенезе и снижении эффективности медикаментозного лечения РПЖ, направленного на модуляцию сигнального пути *AR*. Прогрессирование РПЖ включает две отдельные стадии: локализованный РПЖ и кастрационно-резистентный РПЖ (КР-РПЖ). В первой стадии болезнь может протекать неопределенно долго в дремлющей форме, не угрожающей жизни пациента, или внезапно трансформироваться в агрессивный КР-РПЖ, сопровождающийся быстрым летальным исходом (Mandigo et al., 2021). Потеря *RB* обнаруживается менее, чем у 1% пациентов с локализованным РПЖ, но у 30–60% пациентов с КР-РПЖ (Sharma et al., 2010; McNair et al., 2018).

Механизм утраты pRb свойств опухолевого супрессора при локализованном РПЖ не ясен, но

изучение патогенеза опухолей других тканей позволяет предположить, что в начальной стадии развития опухоли pRb может терять некоторые свойства опухолевого супрессора, что дает возможность опухолевым клеткам получить конкурентные преимущества для размножения (Viatour, Sage, 2011).

Пациенты с раком грудной железы, у которых выявляется потеря pRb, демонстрируют более продолжительный период безрецидивной выживаемости после химиотерапии по сравнению с пациентами с нормальным уровнем pRb (Derenzini et al., 2008). Сигнальный путь Wnt/ β -катенин конститутивно активирован более чем в 90% случаев колоректального рака, при котором в некоторых случаях амплифицируется локус RB (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

Опухоль может использовать разные механизмы отмены негативного влияния pRb на ее рост. В нормальных условиях pRb способствует митохондриальному апоптозу путем увеличения проницаемости внешней митохондриальной мембраны, опосредованному взаимодействием pRb с белком Bax. Потеря RB и его взаимодействия с Bax уменьшает уровень апоптоза и его защитную роль при росте опухоли (Wang et al., 2017). pRb тормозит транскрипцию E2F1, который способствует активации сигнального пути ARF-p53, вызывающего апоптоз (Weber et al., 2000).

В условиях потери pRb могут накапливаться реактивные формы кислорода, вызывающие активацию аутофагии (Ciavatta, Zacksenhaus, 2011). Функции pRb почти всегда сохраняются при раке толстого кишечника, при котором pRb способствует росту опухоли путем транскрипционной супрессии E2F1, тормозящего продукцию β -катенина (Morris et al., 2008).

Другой механизм участия β -катенина в развитии опухолей толстого кишечника реализуется при хроническом воспалении и опосредуется фактором некроза опухолей (TNF). В таких случаях TNF активирует каспазу 8, которая протеолизует pRb в его С-концевой части, тогда как клетки с мутацией RB в С-домене проявляют устойчивость к апоптозу, индуцированному TNF (Chau et al., 2002).

Устойчивость к апоптозу также повышена в клеточных линиях, происходящих из толстого кишечника и экспрессирующих ядерный β -катенин, взаимодействие которого с pRb, вероятно, тормозит митохондриальный апоптоз (Han et al., 2013). Взаимодействие между pRb и β -катенином при локализованном РПЖ не изучалось.

Цель настоящей работы заключалась в изучении взаимодействия pRb с β -катенином в опухолевой и окружающей нормальной ткани ПЖ, полученных от пациентов, подвергнутых радикальной простатэктомии по поводу локализованного РПЖ.

Первая задача работы заключалась в оценке экспрессии эпителиальных маркеров (цитокератина 5 и AR), опухолевого маркера (AMACR), генов CTNNB1 (β -катенина) и RB в опухолевой и нормальной ткани ПЖ.

Вторая задача состояла в определении уровня белков pRb и β -катенина в тех же тканях путем иммуноблотинга и иммунопреципитации.

Третья задача включала в себя оценку взаимодействия pRb и β -катенина в указанных тканях с помощью иммуноблотинга и иммунопреципитации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Пробы ткани ПЖ. Образцы ткани получали от пациентов, подвергнутых радикальной простатэктомии по поводу РПЖ в урологическом отделении Ленинградского областного клинического онкологического диспансера им. Л.Д. Романа (ЛОКОД) в соответствии с протоколом, утвержденным биоэтическим комитетом Института цитологии РАН и согласованным с отделом клинических исследований ЛОКОД.

Пробы ткани ПЖ весом около 100 мг, включая опухолевый узел или нормальную ткань того же слоя, помещали в пробирки с 5 мл стерильной среды RPMI 1640, содержащей 50 мкг/мл гентамицина ("Биолот", Россия). Каждую из двух проб разделяли острыми ножницами на две части, одна из которых предназначалась для экстрагирования тотальной РНК и общеклеточного белка. Вторую часть обрабатывали коллагеназой для приготовления клеточной суспензии, которую использовали в дальнейшем для получения первичных клеточных двумерных культур.

Стабильная клеточная линия T98G. Глиобластома человека T98G широко используется в качестве золотого стандарта клеток, продуцирующих белки pRb и β -катенин (Hansen et al., 2001; Петров и др., 2016; Роров et al., 2020). Клетки были получены из коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в среде DMEM/F12 с 10% фетальной бычьей сыворотки, гентамицином (50 мкг/мл) при 6% CO₂ и 100%-ной влажности.

Получение первичных клеточных культур из образцов тканей ПЖ. Пробы ткани ПЖ, предназначенные для получения клеточных культур, помещали в 100-мм чашки Петри с 10 мл стерильного фосфатно-солевого буферного раствора (PBS). Далее пробы разрезали стерильными ножницами на кусочки размером 1 мм, переносили в 15 мл конические пластиковые пробирки (ТТР, Новосибирск, Россия), и подвергали ферментативной обработке в 1 мл раствора, содержащего 5 мг коллагеназы II типа (Life Technologies, США) в 1 мл среды Advanced DMEM/F12, содержащей 50 мкг/мл пенициллина и стрептомицина, 10 мМ Hepes и 1-кратный GlutaMAX (adDMEM/F12+++, Life Technologies, США).

Далее добавляли ингибитор Rho-киназы Y27632 (Abmole Bioscience, США) до конечной концентрации 10 мкМ и дигидротестостерон (Sigma, США) до конечной концентрации 1 нМ (Drost et al., 2016). Пробирки с материалом инкубировали на ротационном шейкере (PST-60 HL-4, “Биосан”, Латвия) 18 ч при 37 °C и 230 rpm.

Затем суспензии центрифугировали при 250 g 5 мин, клеточные осадки отмывали в 5 мл среды adDMEM/F12, фильтровали через нейлоновое сито с порами 70 мкм (Corning, США), осаждали при 250 g 5 мин, осадок ресуспендировали в 1 мл раствора TrypLE Express (Life Technologies, США) в течение 1 ч на ротационном шейкере (PST-60 HL-4, “Биосан”, Латвия) при 37 °C и 230 rpm.

Затем к суспензии добавляли 5 мл среды adDMEM/F12, клетки осаждали центрифугированием при 250 g 5 мин, осадок ресуспендировали в 500 мкл среды adDMEM/F12+++.

Для подсчета количества клеток 5 мкл клеточной суспензии смешивали с 45 мкл 1%-ной уксусной кислоты и 50 мкл 2%-ного трипанового синего (“Биолот”, Россия), клетки подсчитывали в камере Горяева.

Для получения первичных клеточных культур $2 \cdot 10^5$ клеток из клеточной суспензии добавляли в 4 мл специальной среды SCBM (Lonza, Швейцария) для стромальных клеток ПЖ человека и вносили в 60 мм культуральные чашки, предварительно покрытые коллагеном (“Биолот”, Россия). Имиджи клеток первичных культур получали через 2–4 недели культивирования, используя микроскопа Axiovert 200M (Германия), камеру DFC420 в режиме проходящего света или фазового контраста, объектив 20*/0.5; размер снимка составлял 1728×1296 пикселей.

Извлечение тотальной РНК из проб ткани ПЖ пациентов, синтез кДНК. Пробы ткани ПЖ размером 2×2 мм помещали в стальную ступку, охлаждали жидким азотом и растирали пестиком. Полученный порошок переносили в отдельную пробирку и добавляли 1 мл ExtractRNA (“Евроген”, Россия), оставляли на льду на 5 мин. Затем в каждую пробирку добавляли по 200 мкл охлажденного хлороформа и суспензию перемешивали на вортексе.

После этого пробирки ставили в лед на 3 мин, центрифугировали 15 мин при 4 °C и 13000 g, верхнюю фазу супернатанта переносили в новые пробирки и добавляли 500 мкл изопропанола (Sigma, США). Инкубировали на льду 10 мин, затем центрифугировали 10 мин при 4 °C и 13000 g, удаляли супернатант, добавляли по 1 мл 70%-ного этанола, центрифугировали 5 мин при 4 °C и 7600 g. Полностью удаляли супернатант, осадок сушили при комнатной температуре 10 мин, растворяли в 32 мкл безнуклеазной воды (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали 15 мин при 57.5°C.

Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Для синтеза кДНК 2 мкг РНК смешивали с 1 мкл праймера олиго-дТ18 (“Алкор Био”, Россия), объем смеси доводили до 11 мкл и инкубировали при 70 °C 10 мин; охлаждали, добавляли 2 мкл буфера для обратной транскриптазы (SibEnzyme, Россия), 2 мкл 10 мМ смеси дНТФ (Beagle, Россия), 0.5 мкл ингибитора рибонуклеаз RiboLock (Thermo Scientific, США), 40 ед. обратной транскриптазы (SibEnzyme, Россия), предварительно разведённой в буфере для обратной транскриптазы, и инкубировали 1 ч при 37°C. Реакцию останавливали нагреванием до 70 °C в течение 10 мин.

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ПЦР-ОТ). Смесь реагентов для проведения ПЦР включала в себя: 1 мкл 10 мМ смеси дНТФ (Beagle, Россия), 2.5 мкл 10-кратного буфера для Taq-полимеразы (“Алкор Био”, Россия), 2.5 мкл 10 мМ $MgCl_2$, 1 мкМ прямого и обратного праймеров (“Алкор Био”, Россия), 2 мкл кДНК, 0.25 мкл Taq-полимеразы (“Алкор Био”, Россия) и воду до 25 мкл общего объема реакционной смеси.

Смесь готовили при температуре тающего льда. Амплификацию проводили на термоциклере BioRad T100 (США) при следующем температурном режиме: иницирующее плавление – 1 мин, 94 °C; плавление – 15 с, 94 °C; отжиг – 30 с,

Таблица 1. Праймеры, использованные для амплификации маркерных генов, экспрессирующихся в опухолевой и нормальной ткани предстательной железы

Ген	Прямой праймер, 5'–3'	Обратный праймер, 5'–3'	Размер ампликона, п.о.
<i>CK5</i>	TTCATCGACAAGGTGCGGT	TGAGGTGTCAGAGACATGCG	423
<i>AR</i>	GACATGCGTTTGGAGACTGC	TTTCTTCAGCTTCCGGGCTC	294
<i>AMACR</i>	TGGCCACGATATCAACTATTTGG	ACTCAATTTCTGAGTTTCCACAGAA	247
<i>RB</i>	GCAGTATGCTTCCACCAGGC	AATCCGTAAGGGTGAAGTAGGAAAC	91
<i>CTNNB1</i> (ген β-катенина)	GATTGATTCGAAATCTTGCCCT	CTGATGTGCACGAACAAGCA	101
<i>GAPDH</i>	CCATCTTCCAGGAGCGAGA	GGCAGTGATGGCATGGACTGT	326

58 °С; элонгация – 30 с, 72 °С (40 циклов); плато – 10 мин, 72 °С. Продукты ПЦР-амплификации подвергали электрофорезу в 2%-ном агарозном геле с бромистым этидием, размер отдельных ампликонов в агарозном геле определяли при сравнении их подвижности с маркерами 50 пар оснований (п. о.) (Invitrogen, США) на имиджах, полученных с помощью Bio-Rad ChemiDoc XRS+ (США) (табл. 1).

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Обще-клеточную РНК выделяли при помощи набора для выделения РНК на колонках “Биолабмикс” (Новосибирск, Россия). Осадок клеток ресуспендировали в 50 мкл PBS, добавляли по 350 мкл буфера для лизиса LB из набора, пипетировали, инкубировали в течение 10 мин. Добавляли к лизату равный объем этанола, переносили на колонки, центрифугировали 30 с при 10000 g, удаляли фильтрат. Наносили на колонки по 500 мкл буфера для промывки из набора, центрифугировали 30 с при 10000 g и удаляли фильтрат. Повторяли эту же процедуру с буфером для промывки WB2. Колонки центрифугировали при 10000 g в течение 3 мин для полного удаления промывочного буфера и переносили их в новые микропробирки. Далее на фильтр каждой колонки дважды наносилось по 60 мкл буфера для элюции EB из набора, после чего колонки оба раза инкубировали в течение 1 мин при комнатной температуре и центрифугировали 1 мин при 10000 g.

Количество РНК определяли спектрометрически при длине волны 260 нм. Для синтеза кДНК 2 мкг РНК смешивали с 2 мкл 20 мМ раствора случайного гексапраймера (“Биолабмикс”, Новосибирск, Россия), объем смеси доводили до 12 мкл и инкубировали при 70 °С 3 мин, реакционную смесь охлаждали, добавляли к ней 4 мкл 5-кратного буфера, 1 мкл (200 ед.) обратной транскриптазы М-MuLV-RH (“Биолабмикс”, Новосибирск, Россия), 1 мкл 10 мМ смеси dNTP и 2 мкл 0.1 М

ДТТ, инкубировали 10 мин. при 25 °С и затем 60 мин при 42 °С.

Реакцию останавливали нагреванием до 70 °С в течение 10 мин. ПЦР-РВ проводили на амплификаторе Bio-Rad CFX96 Touch со следующими параметрами: иницирующее плавление – 6 мин. 95°С, плавление – 15 с 95 °С, отжиг – 30 с 60 °С, синтез – 60 с 70 °С, 40 циклов.

Реакционная смесь состояла из 15 мкл 2-кратного раствора HS-qPCR SYBR Blue, содержащего дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dNTP), ПЦР-буфер, MgCl₂, Taq ДНК-полимеразу, SYBR Green I и инертный краситель (“БиоМастер”, Россия), 0.2 мкМ прямого и обратного праймеров (см. табл. 1), синтезированных в компании “Евроген” (Россия), 0.2 мкл кДНК и воды до объема 30 мкл.

В качестве контрольного гена использовали GAPDH. Нормализованную экспрессию рассчитывали по формуле $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{GOI} / \Delta Cq_{GAPDH}$, где *GOI* – ген интереса, а ΔCq – относительное количество, рассчитанное из разницы между средним значением цикла выхода *Cq* и самым низким средним значением *Cq* среди образцов в эксперименте. Для всех генов ПЦР-РВ повторяли шесть раз.

Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле и иммуноблоттинг. Электрофорез белков проводили в 10%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (SDS). Пробы ткани ПЖ размером 2×2 мм помещали в стальную ступку, охлаждали жидким азотом и растирали пестиком. Затем добавляли 100 мкл буферного раствора, содержащего 25 мМ Трис-HCl (pH 7.4), 250 мМ NaCl, 0.25%-ный детергент NP-40, 1 мМ PMSF – коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз (Sigma, США) в разведении 1:100.

Полученные экстракты центрифугировали 15 мин при 13000 g и температуре 4 °С, супернатанты использовали для последующих экспериментов. Пробы уравнивали по количеству

общего белка, определяемого с помощью Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США), переносили в микропробирки, содержащие равный объем буфера для нанесения проб на гель (4% SDS, 20% глицерина, 200 мМ дитиотреита, 120 мМ Трис-Cl (pH 6.8), 0.002% бромфенолового синего), кипятили 5 мин на водяной бане и наносили в объеме 25 мкл, содержащем 50 мкг общего белка, на одну дорожку ПААГ. Электрофоретически разделенные белки переносили с геля на мембрану PVDF с помощью полусухого электропереноса. Белки на мембране выявляли специфическими антителами и визуализировали реактивом ECL (Sigma, США).

Иммунопреципитация. Для преципитации комплексов антиген–антитело образцы ткани растирали в стальной ступке при помощи жидкого азота, лизировали при температуре тающего льда 30 мин. специальным буферным раствором, содержащим 20 мМ Tris-Cl (pH 8.0), 137 мМ NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 мМ EDTA и ингибиторы протеаз и фосфатаз (Sigma, США) в разведении 1:100. Экстракты клеток центрифугировали 15 мин при 13000 g и температуре 4 °C и супернатанты использовали для последующей иммунопреципитации.

С этой целью к 500 мкл клеточного экстракта, содержащего 500 мкг белка, добавляли 5 мкг специфических антител на 90 мин, обработку антителами проводили при постоянной ротации при 4 °C. Затем к экстрактам добавляли 30 мкг антител к иммуноглобулинам кролика (Sigma, США) на 1.5 ч с последующим добавлением 30 мкл 10% протеин-А сефарозы на 1.5 ч.

Преципитаты отмывали путем 3-кратного центрифугирования при 2000 об./мин. в буфере для иммунопреципитации и 2-кратного центрифугирования в таком же буфере без детергента. Последующая обработка включала в себя кипячение проб в течение 5 мин в буфере для нанесения на гель, центрифугирование для отделения сефарозы и нанесение на ПААГ.

Иммунофлюоресцентное окрашивание. Покровные стекла с клетками, распластанными при росте в культуре, переносили в чашки 35 мм, однократно отмывали PBS 5 мин, фиксировали 4%-ным параформальдегидом 15 мин, затем 70%-ным этиловым спиртом в течение ночи при 4 °C; обрабатывали 0.2%-ным “Тритоном X-100” 10 мин, промывали PBS 2 раза по 5 мин; сайты неспецифического связывания антител блокировали 1 ч раствором, содержащим 3% бычьего сывороточного альбумина и 0.1% “Твина 20”.

Затем на клетки наносили специфические антитела (разведение в 50–200 раз) в блокирующем растворе на 1 ч при комнатной температуре, промывали 3 раза по 5 мин. PBS, обрабатывали 1 ч при комнатной температуре вторыми антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой, отмывали 3 раза по 5 мин PBS и заключали в среду Anti-Fade (BioRad, США), уменьшающую неспецифическую флуоресценцию и содержащую краситель DAPI для окраски ДНК. Иммунофлуоресцентные изображения получали на конфокальном электронном сканирующем микроскопе Olympus FV3000 (“Олимпус”, Япония), используя лазеры с длиной волны 405, 561 и 640 нм и объектив с увеличением 60х.

Антитела. Для иммунопреципитации и иммуноблоттинга использовали следующие антитела: кроличьи поликлональные антитела анти-β-катенин (CAT-15, Thermo Fisher Scientific, США), мышинные моноклональные антитела против pRb (C-2) и Gapdh (G-9) (sc-74562 и sc-365062, соответственно; Santa-Cruz, Biothech, США), мышинные моноклональные антитела против AMACR были получены самостоятельно (Popov et al., 2018). Для иммуноблоттинга использовали анти-кроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) (Cell Signaling, США) и анти-мышинные антитела, конъюгированные с HRP (BioRad, США).

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили с использованием средней арифметической величины, ее ошибки и критерия Стьюдента (при $P=0.05$), посчитанных при помощи программы Microsoft Office Excel 2010. Уровень β-катенина определяли по соотношению этого белка с Gapdh на одних и тех же электрофоретических блотах.

Каждый эксперимент повторяли не менее трех раз. Для количественной оценки и сравнения содержания белков на отдельных электрофоретических полосах использовали приложение GelAnalyzer2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика пациентов с локализованным РПЖ, у которых брали пробы ткани простаты. Объектом нашего исследования служили пробы опухолевой и окружающей нормальной ткани предстательной железы 17 пациентов, подвергнутых радикальной простатэктомии по поводу локализованного РПЖ. В момент операционного вмешательства пациентам было от 55 до 73 лет,

Таблица 2. Общая информация, описывающая статус пациентов с локализованным РПЖ, подвергнутых радикальной простатэктомии и давших добровольное согласие на использование ткани ПЖ в исследовании

Номер п.п.	Последовательный номер клинической пробы	Возраст пациента (лет)	Уровень ПСА сыворотки крови при операции, (нг/мл)	Коэффициент Глисона
1	49	73	7.0	6 (3+3)
2	55	56	14.8	5 (3+2)
3	56	60	5.0	6 (3+3)
4	57	68	8.0	
5	58	62	7.0	
6	59	65	8.0	
7	60	73		
8	61	61	9.7	7 (3+4)
9	62	61	8.0	6 (3+3)
10	63	65	9.0	7 (3+4)
11	64	72	11.1	
12	65	69	16.8	6 (3+3)
13	66	66	16.1	
14	67	68	5.1	
15	68	55	5.4	
16	69	61	9.8	
17	70	61	9.7	

уровень ПСА в сыворотке их крови составлял 3.5–16.8 нг/мл и коэффициент Глисона — от 5 (3+2) до 7 (3+4) (табл. 2).

Гены *RB* и *CTNNB1* стабильно экспрессируются в опухолевой и нормальной ткани предстательной железы человека. Результаты ПЦР-ОТ с использованием мРНК, полученной из опухолевой и нормальной ткани ПЖ пациентов, оперированных по поводу локализованного РПЖ, показали, что и в той, и в другой ткани экспрессируются маркер базального слоя эпителия ПЖ цитокератин 5 (ЦК5) и маркер люминального слоя эпителия — андрогенный рецептор (*AR*).

В опухолевой ткани выявляется экспрессия маркера РПЖ *AMACR*, который экспрессируется в меньшем количестве или отсутствует в нормальной ткани (рис. 1а, б). В образцах опухолевой и нормальной ткани пациентов стабильно экспрессируются гены *RB* и *CTNNB1* (β-катенина) (рис. 1а, б). ПЦР в реальном времени показала, что уровень экспрессии этих генов в опухолевой и нормальной ткани ПЖ примерно одинаков (рис. 1в, г).

Уровень β-катенина в опухолевой и нормальной ткани при РПЖ варьирует от пациента к пациенту, а pRb вовсе не определяется в иммуноблоттинге. При использовании нагрузки по общему белку в 50 мкг на дорожку 10%-ного ПААГ β-катенин выявляется в пробах опухолевой и нормальной

тканей пациентов с РПЖ. Выявляемый уровень β-катенина варьирует от пациента к пациенту, но не доминирует ни в опухолевой, ни в нормальной ткани (рис. 2а). В противоположность β-катенину, pRb не определяется в тех же экстрактах тканей ПЖ при иммуноблоттинге, тогда как в контрольных клетках Т98G продукция обоих белков стабильно выявляется на высоком уровне (рис. 2а). Сравнение средних величин уровня β-катенина в опухолевой и нормальной ткани показывает отсутствие различий (рис. 2б). Отсутствие pRb на иммуноблотах клеток ПЖ отчасти связано с низким уровнем его продукции относительно β-катенина, поскольку использование тех же антител против pRb, распознающих эпитоп в С-концевой части белка, позволяет выявить этот белок в иммунопреципитации, совмещенной с иммуноблоттингом, как в опухолевой, так и в нормальной ткани ПЖ (рис. 2в). Результаты иммунофлюоресценции на первичных 2D-культурах, полученных из опухолевой или нормальной ткани ПЖ, показывают, что pRb продуцируется на очень низком уровне и выявляется преимущественно в цитоплазме некоторых клеток, тогда как β-катенин визуализируется на значительно более высоком уровне в цитоплазматической, мембранной и ядерной формах (рис. 2г).

Иммунопреципитация β-катенина и его ко-иммунопреципитация с pRb из экстрактов опухолевой

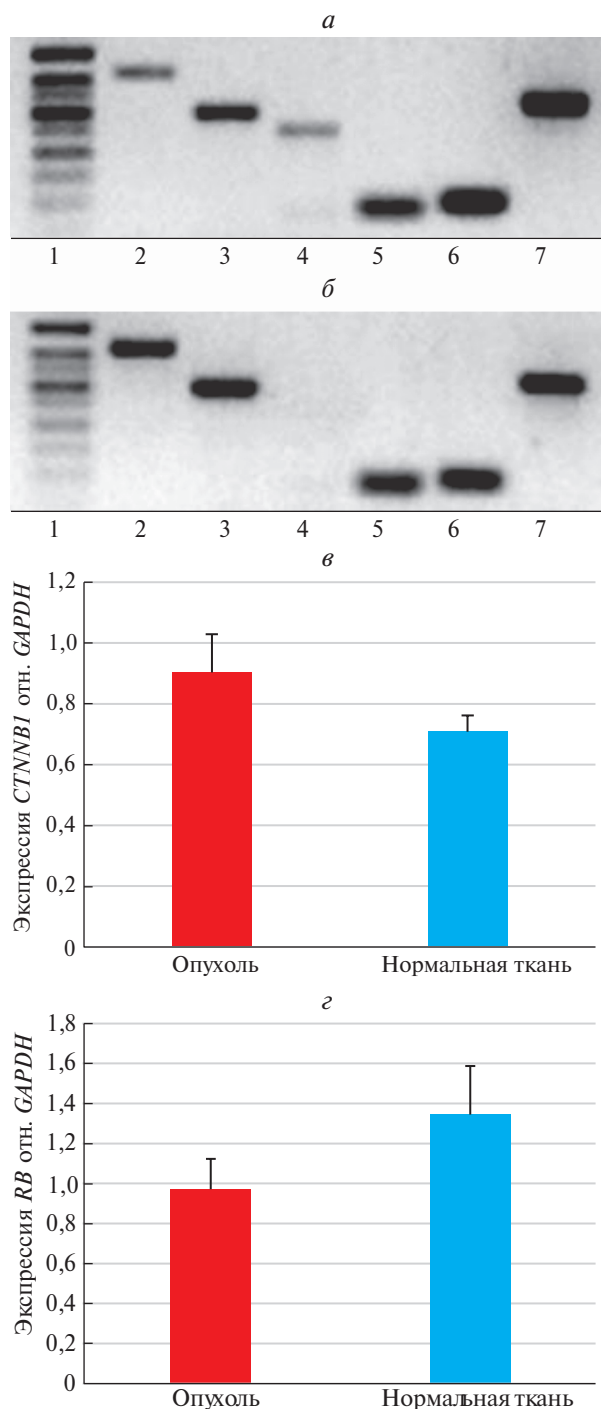


Рис. 1. Амплификация *RB* и *CTNNB1* (ген β -катенина) в опухолевой и нормальной ткани предстательной железы (ПЖ) пациентов, оперированных по поводу РПЖ. ОТ-ПЦР-амплификация маркеров: эпителиальных (ЦК5, AR), опухолевого (*AMACR*), *RB* и *CTNNB1* (гена β -катенина) в опухолевой (а) нормальной (б) ткани ПЖ: 1 – маркер мол. массы 50 п.о., 2 – ЦК5 (423 п.о.), 3 – AR (294 п.о.), 4 – *AMACR* (247 п.о.), 5 – *RB* (91 п.о.), 6 – *CTNNB1* (101 п.о.), 7 – *GAPDH* (326 п.о.); в, г – ПЦР-РВ-амплификация *RB* и *CTNNB1* соответственно; в, г – данные ПЦР-РВ представляют собой среднюю арифметическую величину и ее ошибку ($n=3$).

и нормальной ткани пациентов с локализованным РПЖ. Мы нашли, что хотя β -катенин стабильно выявляется у всех пациентов с РПЖ при иммуноблоттинге, использование тех же антител не приводит к его выявлению в иммунопреципитации, совмещенной с иммуноблоттингом как в опухолевой, так и в нормальной ткани. В противоположность результатам с иммунопреципитацией из экстрактов тканей ПЖ, β -катенин стабильно выявляется при иммунопреципитации теми же антителами из экстрактов клеток линии T98G (рис. 3а).

Мы предполагаем, что отсутствие иммунопреципитации β -катенина из экстрактов ПЖ связано с тем, что сайты его распознавания антителами CAT-15 (Thermo Fisher Scientific, США) экранированы в ПЖ в результате взаимодействия β -катенина с pRb. Это предположение соответствует тому факту, что используемые антитела иммунопреципитируют β -катенин из экстрактов клеток T98G, в которых взаимодействие β -катенина и pRb происходит, вероятно, иначе (см. рис. 3а).

Для проверки этого предположения мы использовали иммунопреципитацию антителами к pRb, совмещенную с иммуноблоттингом антителами против β -катенина. В таком опыте антитела к pRb ко-иммунопреципитируют β -катенин, который выявляется как в экстрактах опухолевых и нормальных клеток ПЖ, так и в экстрактах клеток T98G (см. рис. 3б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Белок pRb играет различную роль в патогенезе локализованного РПЖ и КР-РПЖ. При локализованном РПЖ мутации или потеря гена *RB* встречаются менее, чем у 1% пациентов в противоположность КР-РПЖ, при котором такие нарушения выявляются в 30–60% заболеваний (McNair et al., 2018; Рябов и др., 2022).

Мы предположили, что низкая частота мутаций *RB* и сохранение синтеза его продукта при локализованном РПЖ могут быть связаны с тем, что pRb теряет некоторые функции опухолевого супрессора. Возможно, при локализованном РПЖ подобно тому, что происходит при раке толстого кишечника, опухолевые клетки создают конкурентные преимущества для роста путем модификации и использования pRb в своих целях (Morris et al., 2008; Viatour, Sage, 2011).

Механизм частичной утраты свойств опухолевого супрессора продуктом *RB* может быть

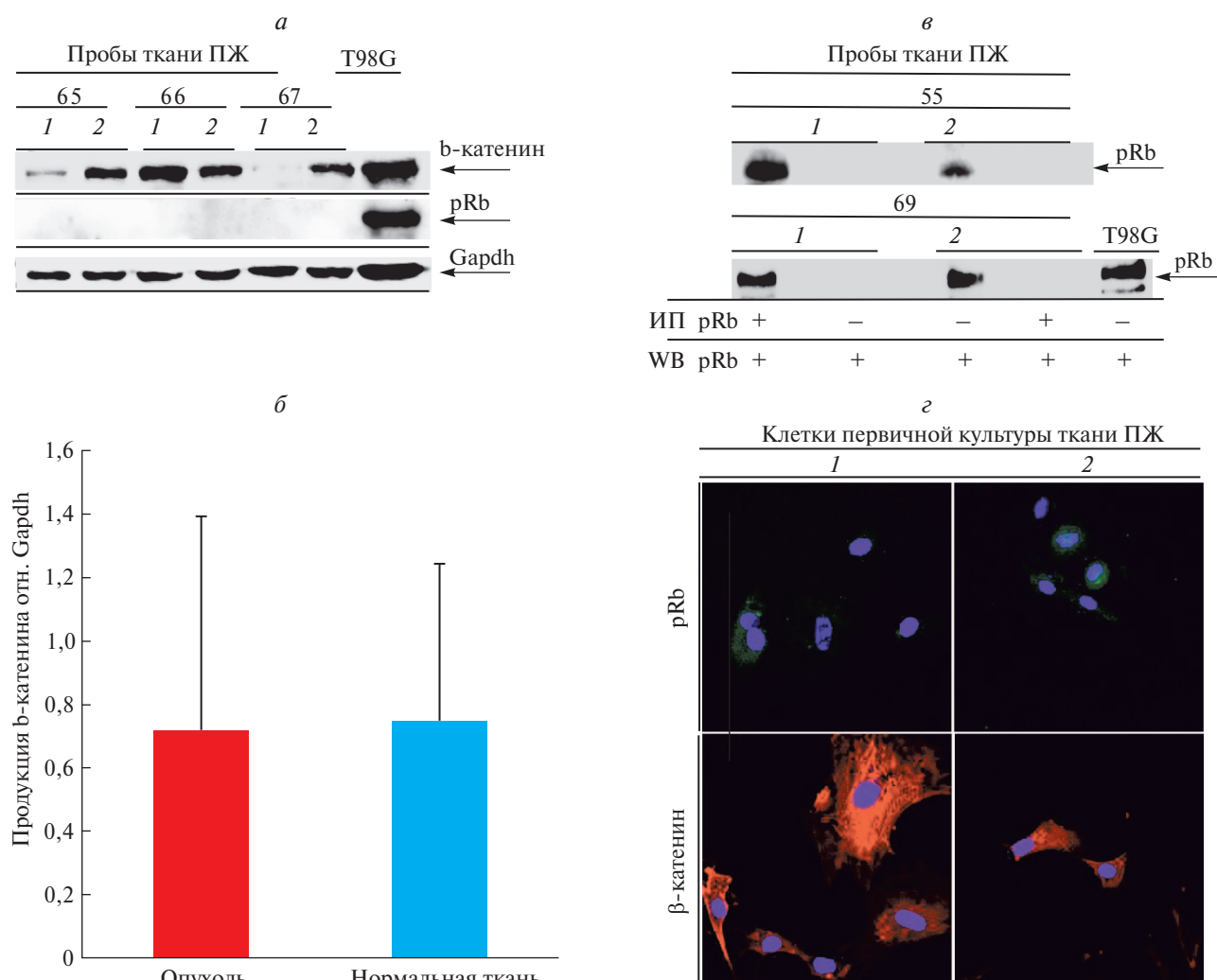


Рис. 2. Уровень β -катенина и pRb в опухолевой (1) и нормальной (2) ткани ПЖ трех клинических проб (65, 66, 67) от пациентов, оперированных по поводу локализованного РПЖ. Иммуноблоттинг (WB) и иммунопреципитация (ИП); а – WB: белки экстрактов ПЖ разделяли путем электрофореза в 10%-ном ПААГ при нагрузке по общеклеточному белку 50 мкг на дорожку; Gapdh определяли для выравнивания нагрузки на разных дорожках, экстракты клеток линии T98G использовали в качестве положительного контроля; б – уровень β -катенина в опухолевой (1) и нормальной (2) ткани ПЖ, показаны средние арифметические величины и их ошибки ($n=7$); в – ИП: pRb из опухолевой и нормальной ткани ПЖ; экстракты, содержащие 50 мкг общеклеточного белка на дорожку, разделяли при электрофорезе в ПААГ и визуализировали с помощью WB; г – иммунофлюоресцентное выявление pRb (зеленый цвет) и β -катенина (красный цвет) в клетках первичных культур из опухолевой (1) и нормальной (2) ткани ПЖ (клиническая проба 70): ядра окрашены DAPI (голубой цвет); конфокальный лазерный сканирующий микроскоп FV3000 (Япония; лазеры 405, 561 и 640 нм), увеличение объектива 60 $\times$.

основан на его взаимодействии с β -катенином в клетках РПЖ, как это происходит в клетках при раке толстого кишечника (Han et al., 2013). Для оценки такого предположения мы сначала оценили экспрессию генов в опухолевой и нормальной ткани ПЖ с помощью ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ.

Результаты опытов показали, что гены *CTNNB1* (ген β -катенина) и *RB* экспрессируются в опухолевой и нормальной ткани ПЖ подобно маркерам базального (ЦК5) и люминального (AR) эпителия. Экспрессия *CTNNB1* и *RB* в опухолевой и нормальной ткани ПЖ существенно не отличается.

В опухолевой ткани дополнительно выявляется AMACR – маркер РПЖ (рис. 1а, б).

При оценке уровня продуктов *CTNNB1* и *RB* (pRb) мы нашли, что β -катенин выявляется в опухолевой и нормальной ткани ПЖ, хотя его уровень изменяется от пациента к пациенту, не показывая доминирования ни в опухолевой, ни нормальной ткани (см. рис. 2а, б). В отличие от β -катенина, pRb не выявляется на иммуноблотах ни в опухолевой, ни в нормальной ткани ПЖ, тогда как в контрольных клетках T98G этот белок выявляется на высоком уровне (см. рис. 2а).

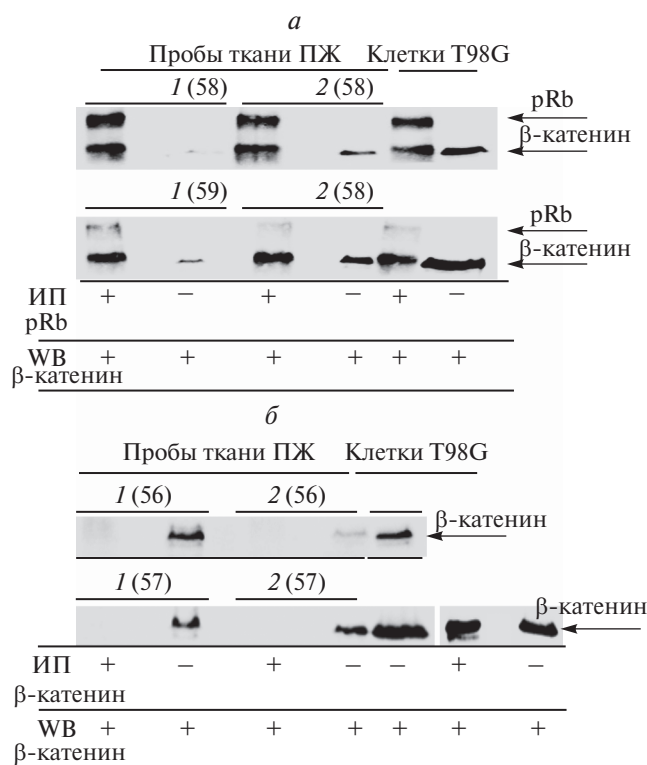


Рис. 3. Белки pRb и β-катенин физически взаимодействуют друг с другом и формируют комплекс в экстрактах ткани предстательной железы человека: *а* – β-катенин (клинические пробы 58 и 59) не преципитируется из экстрактов ткани ПЖ, но выявляется на иммуноблоте антителами CAT-15 (Thermo Fisher Scientific, США), распознающими эпитоп в С-концевом участке молекулы; *б* – антитела к pRb ко-иммунопреципитируют β-катенин из экстрактов ткани ПЖ (клинические пробы 56 и 57). Клетки T98G использовали как положительный контроль. ИП, WB – то же, что и на рис. 2. Показаны результаты для опухолевой (1) и нормальной (2) ткани ПЖ.

С помощью иммунопреципитации pRb выявляется как в опухолевой, так и в нормальной ткани ПЖ, причем в опухолевой ткани его уровень значительно превышает таковой в нормальной ткани (см. рис. 2*в*).

Следующим шагом была оценка физического взаимодействия β-катенина и pRb. Путем ко-иммунопреципитации антителами к pRb нам удалось показать, что эти белки физически взаимодействуют друг с другом и преципитируются в одном комплексе. Ко-иммунопреципитированный антителами против pRb из экстрактов опухолевой и нормальной ткани ПЖ β-катенин выявляется специфическими антителами на иммуноблотах (см. рис. 3*а*). Уровень ко-иммунопреципитированного β-катенина из экстрактов ткани ПЖ подобен таковому из клеток линии T98G (см. рис. 3*а*).

Интересно, что β-катенин не иммунопреципитируется из экстрактов ПЖ теми же специфическими антителами, которыми он распознается в иммублотинге, но иммунопреципитируется из экстрактов контрольных клеток T98G (см. рис 3*б*).

Эти данные дают возможность предположить, что в клетках ткани ПЖ сайт распознавания β-катенина антителами CAT-15 (Thermo Fisher Scientific, США) экранирован от распознавания, поскольку он занят взаимодействующим с ним pRb. В клетках T98G взаимодействие этих белков происходит, вероятно, иначе, поэтому сайт распознавания антителами CAT-15 оказывается открытым и β-катенин эффективно ко-иммунопреципитируется теми же антителами против β-катенина (см. рис. 3*б*).

Найденные нами особенности взаимодействия β-катенина и pRb в клетках ПЖ проходят как в опухолевой, так и нормальной ткани. Возможно, что этот процесс инициируется в опухоли и распространяется на нормальную ткань путем передачи неизвестного фактора, который взаимодействует с С-концевым участком β-катенина, экранируя находящийся там эпитоп связывания антител CAT-15 (Thermo Fisher Scientific, США).

β-Катенин опосредует регуляторное действие на клетку эволюционно консервативного семейства белков Wnt (Wodarz, Nusse, 1998). В присутствии лигандов Wnt цитоплазматический β-катенин становится стабильным, транслоцируется в ядро и активирует транскрипционные факторы семейства LEF/TCF, инициируя продукцию Мус, циклина D1, AR, что ассоциируется с возникновением РПЖ (Kuyta, Waxman, 2012). Мутации β-катенина идентифицированы в 5% проб тканей с РПЖ (Voeller et al., 1998).

Кроме того, инактивация β-катенина способствуют мутации опухолевых супрессоров APC и AXIN1, продукты которых входят в состав комплекса, способствующего его деструкции (Schneider, Logan, 2018). Подобно pRb, β-катенин имеет множественные точки влияния на продукцию AR. В регуляторной области гена AR находятся три активных сайта связывания LEF/TCF, передача сигналов Wnt/β-катенин может сопровождаться повышением уровня транскрипции AR (Yang et al., 2006).

Торможение GSK-3β, эффекторной киназы комплекса, инактивирующего β-катенин в цитоплазме, может способствовать репрессии AR и росту РПЖ (Mazor et al., 2004). Мишень сигнального пути Wnt/β-катенин, продукт гена циклина D1, может подавлять сигнальный путь AR (Petre et al.,

2002). В опытах *in vivo* на мышинной модели РПЖ показано, что сверхэкспрессия β -катенина вызывает выраженную интраэпителиальную неоплазию и резистентность к антиандрогенной терапии (Yu et al., 2009).

Изложенные данные из литературы показывают, что pRb и β -катенин имеют множественные точки синергичного и антагонистического влияния на продукцию AR и прогрессирование РПЖ. Дальнейшее изучение механизмов сочетанной роли этих факторов может раскрыть новые стороны патогенеза локализованного РПЖ и его перехода в КР-РПЖ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам группы конфокальной микроскопии и анализа изображений Института цитологии РАН за помощь в проведении фазово-контрастной и сканирующей микроскопии, а также сотрудникам ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных”, имеющего финансовую поддержку Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-683), за предоставление клеточной линии T98G.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-00162).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Образцы ткани предстательной железы получали от пациентов, подвергнутых радикальной простатэктомии по поводу рака ПЖ в отделении урологии Ленинградского областного клинического онкологического диспансера им. Л.Д. Романа. Забор материала проводили согласно протоколу № 19, утвержденному биоэтической комиссией Института цитологии РАН 4 мая 2023 г. и согласованному с отделом клинических исследований онкологического диспансера им. Л.Д. Романа. Экспериментов с участием животных авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Петров Н.С., Воскресенский М.А., Грозов Р.В., Коршак О.В., Зарицкий А.Ю., Верещагина Н.А., Комяков Б.К., Попов Б.В. 2016. Маркеры клеток базального слоя эпителия предстательной железы являются эффективными индикаторами ее злокачественной трансформации. Цитология. Т. 58. С. 526. (Petrov N.S., Voskresenskiy M.A., Grozov R.V., Korshak O.V., Zaritskiy A.Y., Vereschagina N.A., Komyakov B.K. and Popov B.V. 2017. Markers of the basal cell layer of prostate are effective indicators of its malignant transformation. Cell Tiss. Biol. V. 11. P. 205). <https://doi.org/10.1134/S1990519X17030099>
- Рябов В.М., Воскресенский М.А., Попов Б.В. 2022. Роль опухолевого супрессора RB в развитии локализованного и кастрационно-резистентного рака предстательной железы. Цитология. Т. 64. С. 208. (V.M. Ryabov, M.A. Voskresenskiy, B.V. Popov. 2022. Role of the tumor suppressor RB in the development of localized and castration-resistant prostate cancer. Cell Tiss. Biol. V. 16. P. 434). <https://doi.org/10.1134/S1990519X2205008X>
- Balk S.P., Knudsen K.E. 2008. AR, the cell cycle, and prostate cancer. Nucl Recept Signal. V. 6. P. e001. <https://doi.org/10.1621/nrs.06001>
- Cancer Genome Atlas Network. 2012. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature. V. 487. P. 330. <https://doi.org/10.1038/nature11252>
- Chau B.N., Borges H.L., Chen T.T., Masselli A., Hunton I.C., Wang J.Y. 2002. Signal-dependent protection from apoptosis in mice expressing caspase-resistant Rb. Nat. Cell Biol. V. 4. P. 757. <https://doi.org/10.1038/ncb853>
- Ciavarrà G., Zacksenhaus E. 2011. Direct and indirect effects of the pRb tumor suppressor on autophagy. Autophagy. V. 7. P. 544. <https://doi.org/10.4161/auto.7.5.15056>
- Cunha G.R. 1994. Role of mesenchymal-epithelial interactions in normal and abnormal development of the mammary gland and prostate. Cancer. V. 74. P. 1030. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19940801\)74:3+<1030:aid-cncr2820741510>3.0.co;2-q](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19940801)74:3+<1030:aid-cncr2820741510>3.0.co;2-q)
- Derenzini M., Donati G., Mazzini G., Montanaro L., Vici M., Ceccarelli C., Santini D., Taffurelli M., Treré D. 2008. Loss of retinoblastoma tumor suppressor protein makes human breast cancer cells more sensitive to antimetabolite exposure. Clin. Cancer Res. V. 14. P. 2199. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-2065>
- Dick F.A., Goodrich D.W., Sage J., Dyson N.J. 2018. Non-canonical functions of the RB protein in cancer. Nat. Rev. Cancer. V. 18. P. 442. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0008-5>
- Dyson N. 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. Genes Dev. V. 12. P. 2245. <https://doi.org/10.1101/gad.12.15.2245>
- Friend S.H., Bernards R., Rogelj S., Weinberg R.A., Rapaport J.M., Albert D.M., Dryja T.P. 1986. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. Nature. V. 323. P. 643. <https://doi.org/10.1038/323643a0>
- Han J., Soletti R.C., Sadarangani A., Sridevi P., Ramirez M.E., Eckmann L., Borges H.L., Wang J.Y. 2013. Nuclear expression of β -catenin promotes RB stability and

- resistance to TNF-induced apoptosis in colon cancer cells. *Mol. Cancer Res.* V. 11. P. 207. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0670>
- Hansen K., Farkas T., Lukas J., Holm R., Rönstrand L., and Bartek J. 2001. Phosphorylation-dependent and -independent functions of p130 cooperate to evoke a sustained G₁ block. *EMBO J.* V. 20. P. 422. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.3.422>
- Kareta M.S., Gorges L.L., Hafeez S., Benayoun B.A., Marro S., Zmoos A.F., Cecchini M.J., Spacek D., Batista L.F., O'Brien M., Ng Yi-H., Ang C.E., Vaka D., Artandi S.E., Dick F.A., Brunet A. et al. 2015. Inhibition of pluripotency networks by the Rb tumor suppressor restricts reprogramming and tumorigenesis. *Cell Stem Cell.* V. 16. P. 39. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.10.019>
- Kypta R.M., Waxman J. 2012. Wnt/ β -catenin signalling in prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* V. 9. P. 418. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.10.019>
- Lee W.H., Bookstein R., Hong F., Young L.J., Shew J.Y., Lee E.Y. 1987. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science.* V. 235. P. 1394. <https://doi.org/10.1126/science.3823889>
- Mandigo A.C., Tomlins S.A., Kelly W.K., Knudsen K.E. 2021. Relevance of pRB Loss in Human Malignancies. *Clin. Cancer Res.* V. 28. P. 255. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-1565>
- Mazor M., Kawano Y., Zhu H., Waxman J., Kypta R.M. 2004. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 represses androgen receptor activity and prostate cancer cell growth. *Oncogene.* V. 23. P. 7882. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208068>
- McNair C., Xu K., Mandigo A.C., Benelli M., Leiby B., Rodrigues D., Lindberg J., Gronberg H., Crespo M., De Laere B., Dirix L., Visakorpi T., Li F., Feng F.Y., de Bono Jye Demichelis F. et al. 2018. Differential impact of RB status on E2F1 reprogramming in human cancer. *J. Clin. Invest.* V. 128. P. 341. <https://doi.org/10.1172/JCI93566>
- Morris E.J., Ji J.Y., Yang F., Di Stefano L., Herr A., Moon N.S., Kwon E.J., Haigis K.M., Näär A.M., Dyson N.J. 2008. E2F1 represses beta-catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8. *Nature.* V. 455. P. 552. <https://doi.org/10.1038/nature07310>
- Petre C.E., Wetherill Y.B., Danielsen M., Knudsen K.E. 2002. Cyclin D1: mechanism and consequence of androgen receptor co-repressor activity. *J. Biol. Chem.* V. 277. P. 2207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106399200>
- Popov B.V., Sutula G.I., Petrov N.S., Yang X.J. 2018. Preparation and characterization of the antibody recognizing AMACR inside its catalytic center. *Int. J. Oncol.* V. 52. P. 547. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4220>
- Popov B., Petrov N., Ryabov V., Evsyukov I. 2020. p130 and pRb in the maintenance of transient quiescence of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int.* Article ID 8883436. <https://doi.org/10.1155/2020/8883436>
- Sage J. 2012. The retinoblastoma tumor suppressor and stem cell biology. *Genes Dev.* V. 26. P. 1409. <https://doi.org/10.1101/gad.193730.112>
- Schneider J.A., Logan S.K. 2018. Revisiting the role of Wnt/ β -catenin signaling in prostate cancer. *Mol. Cell Endocrinol.* V. 462. P. 3. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.02.008>
- Sharma A., Yeow W.S., Ertel A., Coleman I., Clegg N., Thangavel C., Morrissey C., Zhang X., Comstock C.E., Witkiewicz A.K. et al. 2010. The retinoblastoma tumor suppressor controls androgen signaling and human prostate cancer progression. *J. Clin. Invest.* V. 120. P. 4478. <https://doi.org/10.1172/JCI44239>
- Sherr C.J. 1996. Cancer cell cycles. *Science.* V. 274. P. 1672. <https://doi.org/10.1126/science.274.5293.1672>
- Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A. 2021. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J. Clin.* V. 71. P. 7. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>
- Tomlins S.A., Laxman B., Varambally S., Cao X., Yu J., Helgeson B.E., Cao Q., Prensner J.R., Rubin M.A., Shah R.B., Mehra R., Chinnaiyan A.M. 2008. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia.* V. 10. P. 177. <https://doi.org/10.1593/neo.07822>
- Truica C.I., Byers S., Gelmann E.P. 2000. Beta-catenin affects androgen receptor transcriptional activity and ligand specificity. *Cancer Res.* V. 60. P. 4709.
- Viatour P., Sage J. 2011. Newly identified aspects of tumor suppression by RB. *Dis. Model. Mech.* V. 4. P. 581. <https://doi.org/10.1242/dmm.008060>
- Voeller H.J., Truica C.I., Gelmann E.P. 1998. Beta-catenin mutations in human prostate cancer. *Cancer Res.* V. 58. P. 2520.
- Wang C.Y., Xu Z.B., Wang J.P., Jiao Y., Zhang B. 2017. Rb deficiency accelerates progression of carcinoma of the urinary bladder in vivo and in vitro through inhibiting autophagy and apoptosis. *Int. J. Oncol.* V. 50. P. 1221. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3889>
- Weber J.D., Kuo M.L., Bothner B., DiGiammarino E.L., Kriwacki R.W., Roussel M.F., Sherr C.J. 2000. Cooperative signals governing ARF-mdm2 interaction and nucleolar localization of the complex. *Mol. Cell Biol.* V. 20. P. 2517. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.7.2517-2528.2000>
- Weinberg R.A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell.* V. 81. P. 323. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90385-2)
- Wodarz A., Nusse R. 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* V. 14. P. 59. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.14.1.59>
- Yang X., Chen M.W., Terry S., Vacherot F., Bemis D.L., Capodice J., Kitajewski J., de la Taille A., Benson M.C., Guo Y., Buttyan R. 2006. Complex regulation of human androgen receptor expression by Wnt signaling in prostate cancer cells. *Oncogene.* V. 25. P. 3436. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209366>
- Yu X., Wang Y., Jiang M., Brier B., Roy-Burman P., Shen M.M., Taketo M.M., Wills M., Matusik R.J. 2009. Activation of beta-catenin in mouse prostate causes HGPIN and continuous prostate growth after castration. *Prostate.* V. 69. P. 249. <https://doi.org/10.1002/pros.20877>
- Xu Y., Chen S.Y., Ross K.N., Balk S.P. 2006. Androgens induce prostate cancer cell proliferation through mammalian target of rapamycin activation and post-transcriptional increases in cyclin D proteins. *Cancer Res.* V. 66. P. 7783. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4472>

INTERACTION OF pRb AND beta-CATENIN IN CANCER AND NORMAL TISSUE IN THE HUMAN PROSTATE

V. M. Ryabov^a, N. I. Tyapkin^b, A. P. Rodimzev^a, O. G. Lyublinskaya^a,
I. V. Guzhova^a, B. V. Popov^{a, *}

^a*Institute of Cytology Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064, Russia*

^b*Roman Leningrad Regional Clinical Oncological Dispensary, Ministry of Health
of the Russian Federation, Kuzmolovo, 188663, Russia*

** E-mail: voldemryabov@yandex.ru*

Prostate cancer (PCa) is one of the most common oncological diseases, which goes through two stages in its development. The first stage, localized prostate cancer, can proceed indefinitely in a dormant form that does not require active medical intervention, or suddenly turn into an aggressive metastatic form with lethal outcome. The pathogenesis of the transition of the dormant form of PCa to the metastatic form remains not fully understood. The signaling pathways of the tumor suppressor pRb and the proto-oncogene β -catenin are probably the most involved in the pathogenesis of PCa but the role of their interaction in the pathogenesis of prostate cancer has not been studied. The publication on the pathogenesis of tumors in other tissues suggests that pRb may lose some properties of a tumor suppressor at the initial stage of PCa development due to its interaction with β -catenin that enables tumor cells to gain competitive advantages for reproduction. In this work, we have shown that the *RB* and β -catenin (*CTNNB1*) genes are well expressed in tumor and normal prostate tissue. Unlike β -catenin, pRb is not detected by immunoblotting in tumor and normal prostate tissue, but is easily determined in this way in extracts of control T98G cells. Co-immunoprecipitation with antibodies to pRb from extracts of tumor and normal prostate tissue makes it possible to detect this protein and β -catenin by subsequent immunoblotting, which indicates the physical interaction of these proteins in prostate tissue. On the other hand, immunoprecipitation of β -catenin with antibodies to its C-terminal fragment does not detect this protein in prostate extracts by subsequent immunoblotting using the same antibody. In contrast to prostate tissue, β -catenin is readily detected by immunoprecipitation combined with immunoblotting in T98G control cell extracts. The obtained data suggest that pRb and β -catenin physically interact with each other in cells of different tissue specificity. In T98G cells, this interaction probably occurs through the C-terminal fragment of β -catenin, but in prostate cells it occurs in a different way, since the C-fragment of β -catenin is shielded from such interaction, possibly due to its physical association with pRb.

Keywords: localized prostate cancer, signal pathway, pRb, β -catenin, interaction