

УДК 576.53

ПАРАМЕТРЫ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ И ПРОЛИФЕРАЦИИ В КЛЕТКАХ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА С ИЗМЕНЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ИЗОФОРМ МИОЗИНА 1С

© 2024 г. Е. С. Соломатина¹, Е. Н. Нишкомаева¹, А. В. Ковалева^{1,2}, А. В. Творогова³,
Д. М. Поташникова¹, А. А. Саидова^{1,2,*}

Представлено академиком РАН С.Г. Георгиевой

Поступило 09.10.2023 г.

После доработки 17.10.2023 г.

Принято к публикации 17.10.2023 г.

Миозин 1С — мономерный миозиновый мотор с укороченным хвостовым доменом. Такие белки представляют собой медленные «сенсоры натяжения». Три изоформы миозина 1С отличаются по коротким N-концевым последовательностям, функциональные отличия для них не описаны. Изоформа А миозина 1С была описана как диагностический маркер рака предстательной железы, однако ее роль в опухолевой трансформации остается неизвестной. Исходя из данных о функциях миозина 1С, нами была выдвинута гипотеза о потенциальном участии изоформ миозина 1С в поддержании опухолевого фенотипа клеток рака простаты. Мы показали, что снижение уровня экспрессии изоформы С миозина 1С приводит к повышению пролиферативной активности опухолевых клеток предстательной железы. ключевые слова: миозин 1С, изоформы, рак предстательной железы, пролиферация.

Принятые сокращения: NLS — сигнал ядерной локализации; PH — домен гомологии плекстрина, TH1 — домен хвостовой гомологии, NM1 — первый ядерный миозин, B-WICH — хроматин-ремоделирующий комплекс B-WICH, FBS — эмбриональная сыворотка теленка, TMRE — тетраметилродамин, этиловый эфир.

Ключевые слова: миозин 1С, изоформы, рак предстательной железы, пролиферация

DOI: 10.31857/S2686738924010075, EDN: I KUIVJF

ВВЕДЕНИЕ

Миозин 1С является первым мономерным миозином, изолированным из тканей млекопитающих и характеризующимся наличием типичной для миозиновых моторов трехдоменной структуры с характерными для данного класса миозинов отличиями, определяющими его специальные функции. N-концевой моторный домен этого белка («головка») способен к связыванию актина и АТФ, причем скорость гидролиза АТФ является довольно низкой, в результате чего данный тип миозинов вы-

полняет в клетке функцию сенсора натяжения [1]. Участок тяжелой цепи, с которым ассоциированы легкие цепи («шейка»), содержит регуляторные домены, способные связывать кальмодулин, кальций и деацетилазу гистонов, а также содержит сигнал ядерной локализации. С-концевой домен («хвост») включает в себя домен гомологии плекстрина (PH), домен гомологии хвоста (TH1) и обеспечивает специальные функции миозинов [2].

В клетке миозин 1С представлен тремя изоформами, различающимися только своими N-терминальными участками: по сравнению с наиболее короткой изоформой С, изоформа В содержит дополнительные 16 аминокислот, а изоформа А — 35, 10 из которых для изоформ А и В являются общими [3]. Несмотря на высокий уровень структурной гомологии и наличие NLS-последовательности в общем для всех трех изоформ участке, эти белки характеризуются различным ядерно-цитоплазматическим соотношением: изоформа С преимущественно локализуется в цитоплазме; для изоформ А и В характерна преимущественно ядерная лока-

¹ Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта, Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Москва, Россия

*E-mail: saidova@mail.bio.msu.ru

лизация, причем изоформа В в первую очередь локализуется в нуклеоплазме и ядрышке, в то время как изоформа А в ядрышке не локализуется, но ассоциирована с ядерными спеклами [4,5].

Большая часть функциональных исследований направлена на изучение общей фракции миозина 1С вне зависимости от принадлежности к определенной изоформе. Так как данный белок способен взаимодействовать и с липидами, и с актином, миозин 1С обеспечивает непосредственное взаимодействие и генерацию механической силы между актиновыми микрофиламентами и фосфоинозитолом клеточной мембраны через РН домен, участвуя в целом ряде внутриклеточных процессов. Так, миозин 1С участвует в поддержании положения Е-кадгерина в клеточных контактах [6]. Также снижение уровня экспрессии миозина 1С приводит к нарушению образования плотных контактов и клеточной миграции подоцитов [7]. В нейронах миозин 1С участвует в образовании ламеллоподий, ограничивая их протрузию и регуляции ретроградного тока актина [8]. В адипоцитах миозин 1С ускоряет экзоцитоз везикул, содержащих переносчик глюкозы GLUT4, стимулируя транспорт глюкозы в адипоциты [9]. Наиболее полно функции миозина 1С изучены на модели сенсорных клеток внутреннего уха, где этот белок участвует в быстром закрытии катион-селективных каналов [10].

Изоформа А миозина 1С является тканеспецифичной и характерна для нормальной ткани почек, надпочечников, поджелудочной железы и яичников [11], тогда как остальные изоформы экспрессируются на сходном уровне во всех тканях и органах. Было предложено использовать эту изоформу как опухолеспецифичный маркер, так как ее гиперэкспрессия характерна для клеток рака простаты и опухолевой ткани простаты модельных мышей линии TRAMP [11]. При анализе экспрессии изоформы А в клеточных линиях рака простаты было показано, что методом ПЦР в реальном времени возможно детектировать повышение уровня экспрессии мРНК данной изоформы даже в образцах с малым количеством клеток или в образцах с большим количеством стромального компонента [12]. Кроме того, уровень экспрессии изоформы А достоверно повышен в клинических образцах рака простаты и позволяет отличить не только опухолевый процесс от реактивной доброкачественной гиперпла-

зии простаты, но и стадии опухоли между собой, что открывает новые перспективы в использовании ее в качестве диагностического и прогностического маркера [13]. В настоящей работе мы предположили, что экзогенное изменение уровня экспрессии миозина 1С может влиять на баланс параметров гибели клеточных линий рака простаты. Для проверки этой гипотезы мы получили модельные клеточные линии рака простаты с индуцибельной экспрессией изоформ А и С миозина 1С (модель повышенной экспрессии) и использовали миРНК к изоформам А и С миозина 1С (модель сниженной экспрессии). На модельных клеточных линиях PC-3 и LNCaP с повышенной и сниженной экспрессией изоформ миозина 1С мы проанализировали пролиферативную активность клеток с использованием маркера Ki-67 и спонтанную клеточную гибель с помощью маркера аннекрина V и потенциал-зависимого красителя TMRE.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии

Линии клеток рака простаты человека PC-3 (CRL-1435) и LNCaP (CRL-1740) были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC, США). Клетки культивировали в среде DMEM: F12 (1:1) с добавлением 10% фетальной сыворотки теленка (HyClone, США), 0.01 г/л гентамицина, 0.3% амфотерицина В и 584 г/л L-глутамин (ПанЭко, Россия). Пассирование проводили раз в три дня в соотношении 1:5 с использованием 0.05% раствора трипсина-ЭДТА (“ПанЭко”, Россия).

Трансфекция миРНК

С помощью онлайн-инструмента <https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaexpress/> были написаны миРНК для нокдауна изоформы А и для нокдауна всех трех изоформ миозина 1С. Последовательности миРНК приведены в табл. 1, синтез и отжиг последовательностей был проведен в “ДНК-Синтез” (Россия). Трансфекцию миРНК проводили с использованием трансфецирующего агента Turbofect (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкциям производителя, концентрация миРНК составила 200 пкмоль/мкл, для трансфек-

Таблица 1. Последовательности миРНК для нокдауна изоформ миозина 1С

Изоформа миозина 1С	Последовательность
siMYO1CA	AUGAACCACGCGGAUGAUCUCCdTdT
siMYO1CC	CCUAUCGCCGCAAAUACGAAGCdTdT

пии использовали среду knock-out DMEM (Thermo Fisher Scientific, США). Физиологические эффекты в клетках изучали после 92 ч воздействия. Клетки снимали с помощью 0.05% раствора трипсина-ЭДТА и культуральной среды, центрифугировали при 750 g в течение 5 минут. В ходе любого эксперимента часть клеток отбирали для дальнейшей верификации подавления экспрессии.

Выделение РНК и ПЦР в реальном времени

Для определения уровня экспрессии изоформ миозина 1C из сухих осадков клеток РС-3 была выделена тотальная РНК с использованием коммерческого набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США) по рекомендациям производителя. Измерение концентрации РНК и оценку ее качества проводили на спектрофотометре NanoPhotometer (Implen, Германия).

В реакцию обратной транскрипции, проводимую с помощью коммерческого набора MMLV RT kit для синтеза кДНК (Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя, брали по 1 мкг РНК. При проведении ПЦР в реальном времени использовался неспецифичный ДНК-интеркалятор SYBR Green I (набор реагентов iTaq, Bio-Rad, США). Рабочая концентрация каждого праймера составила 10 пмоль. Для каждой пары праймеров ставили три технические повторности. Праймеры для ПЦР в реальном времени были синтезированы в ООО “Евроген” (Россия), последовательности приведены в табл. 2, праймеры для референтных генов описаны в статье [12]. Первичный анализ результатов ПЦР в реальном времени проводился по описанной методике [14].

Получение стабильных клеточных линий с индуцибельной экспрессией изоформ миозина 1C

На матрице РНК, выделенной из клеток РС-3 тризольным методом, была получена кДНК с помощью обратной транскриптазы (Maxima Reverse Transcriptase, Thermo Fisher Scientific, США). Последовательности поднимали на матрице кДНК с помощью Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB,

США). Для дальнейшего лигирования в праймеры были добавлены последовательности сайтов рестрикции *XhoI* и *NheI*. Лигирование полученных последовательностей во вспомогательный вектор pBlu2SKM (далее – pSK) провели по сайту *EcoRV*. Реакцию лигирования в pSK ставили в соотношении 1:3 (50 нг вектора + по 150 нг вставок) с использованием Rapid DNA Ligation Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Трансформация осуществлялась в *E. coli* – *XL1* – *Blue* методом электропорации. Оценка лигирования проводилась с помощью пробных рестрикций плазмид по сайту рестрикции *Hind III*. Отобранные на основании пробных рестрикций клоны очищали на колонках HiPure Gel DNA Mini Kit (Magen, КНР). Целостность сайтов рестрикции *XhoI* и *NheI*, а также отсутствие точечных мутаций подтверждали секвенированием по Сэнгеру, осуществленному ЗАО “Евроген” (Россия). С полученных векторов был поднят ПЦР-продукт размером в 5kb с помощью Invitrogen Platinum SuperFi II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя. С использованием NEBuilder HiFi DNA Assembly (NEB, США) из двух дополнительных фрагментов был собран вектор pSLIK – Flag со вставками изоформ А и С миозина 1C размером 15.5 kb. Трансформация осуществлялась в *Sfbl E. coli* методом электропорации. Оценка клонов проводилась с помощью пробных рестрикций плазмид по сайтам рестрикции *BamHI* и *NdeI*. Лентивирусные частицы собирали с использованием плазмид pSLIK(Flag) -MYO1C-iso A/C и вспомогательных плазмид VSV-G и pCMV-dR8.2 в клетках культуры НЕК293Т. Кондиционированную среду после трансфекции отбирали каждые 24 ч в течение трех суток, после центрифугирования супернатанты фильтровали через фильтр в 0.22 мкм. Стабильные линии отбирали с помощью селективного антибиотика G418 (Thermo Fisher Scientific, США) с рабочей концентрацией 0.0005 г/мл. Верификация увеличения уровня экспрессии данных генов проводилась методом Вестерн-блот анализа. Физиологические эффекты в клетках изучали после 72 часов индукции экспрессии при добавлении доксициклина в концентрации 0.001 мг/мл.

Таблица 2. Праймеры для ПЦР в реальном времени

Изоформа миозина 1C	Нуклеотидная последовательность праймера 5' – 3'	Температура отжига, °C
А	for: GCTCGAGGCGCTGCAAGTGGAGCTGG	65
	rev: CGCTAGCTCACCGAGAATTCAGCCGTGG	
С	for: GTACAGCGTGCGGACAATAAGC	62
	rev: CCTTGGTGATGAGCAGCTCC	

Вестерн-блот анализ

Клетки снимали 0.05% раствором трипси-на-ЭДТА и центрифугировали при 750 g в течение 5 мин, супернатант удаляли, эппендорфы с клеточными осадками помещали на лед. Клетки лизировали, добавляя 100 мкл RIPA буфера с PIC, PHIC II и PHIC III (Merck, США). Образцы инкубировали на льду в течение 30 мин, после чего центрифугировали в течение 20 мин при +4 °C на 12000 g. Белки разделяли с помощью электрофореза в 7.5% в полиакриламидном геле, перед нанесением образцы инкубировали 15 мин при 98 °C. Перенос на нитроцеллюлозную мембрану (Thermo Fisher Scientific, США) проводили при 80 мА в течение 70 мин. После переноса инкубировали мембрану в течение 30 минут в 5% растворе молока (Nonfat Dry Milk, Cell Signaling, США). Далее мембрану инкубировали в течение 8 часов при +4 °C в растворе первичных антител к пептиду FLAG (клон M2, Sigma, США) или к тотальному миозину 1C (клон EPR14771, Abcam, США) в 5% растворе молока и затем инкубировали со вторыми антителами anti-mouse IgG (клон 7076, Cell Signaling, США) Для проявления использовали Pierce™ ECL Western Blotting (Thermo Fisher Scientific, США)

Анализ клеточного цикла

Анализ клеточного цикла проводился методом проточной цитометрии при стандартном окрашивании йодидом пропидия (Amresco, США), как было описано ранее [15]. При записи данных использовался прибор FACSAria SORP с ПО FACSDiva 6.2 (BD Biosciences, США).

Анализ пролиферативного потенциала

Анализ пролиферативного потенциала проводился методом проточной цитометрии при окрашивании на маркер пролиферирующих клеток Ki-67. Собранную суспензию клеток фиксировали 1% параформальдегидом (Merck, США) 10 минут при комнатной температуре, отмывали 1 раз PBS, пермеабелизировали 1-кратным раствором Perm II (BD Biosciences, США) согласно рекомендациям производителя. После отмывки PBS клетки окрашивали анти-Ki-67-FITC антителами (клон B56, (BD Biosciences, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Полигон Ki-67+ клеток в препарате выделяли при сравнении с негативным контролем — неокрашенной суспензией тех же клеток.

Анализ клеточной гибели

Спонтанную клеточную гибель оценивали методом проточной цитометрии при окрашивании потенциал-зависимым красителем TMRE (Thermo

Fisher Scientific, США) и аннексином V-FITC (BioLegend, США) для выявления экстернализованного фосфатидилсерина. Протокол совместного окрашивания TMRE и аннексином V был описан ранее [16]. При записи и анализе данных использовался прибор FACSAria SORP с ПО FACSDiva 6.2.

Анализ и представление данных

Данные проточной цитометрии анализировали в программе Diva 6.2.1 (BD Biosciences, США). При анализе данных субпопуляции, соответствующие разным фазам клеточного цикла, выделялись автоматически при помощи ПО ModFit LT 3.3. Построение графиков и анализ проводились в программе GraphPad Prism 8. Для статистического анализа различий использовали критерий Краскела-Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень экспрессии изоформ миозина 1C в модельных клеточных линиях

Оценка эффективности воздействия миРНК к изоформам миозина 1C проводилась методом ПЦР в реальном времени. Использование миРНК к изоформе А позволило снизить уровень экспрессии этой изоформы в клетках РС-3 в 2.9 раза, тогда как уровень экспрессии изоформы С относительно контроля значимо не изменился (рис. 1, а), что говорит о специфичности миРНК к изоформе А. Использование миРНК к изоформе С позволило снизить уровень экспрессии изоформы А в 4.2 раза, уровень экспрессии изоформы С снизился в 4.6 раза, так как миРНК к изоформе С подавляет экспрессию как более короткой изоформы С, так и более длинной изоформы А.

Подтверждение эффективности индуцированного доксициклином повышения экспрессии изоформ миозина 1C в модельных клеточных линиях LNCaP было проведено методом Вестерн-блоттинга (рис. 1, б). В работе мы получили клеточные линии LNCaP с индуцируемой экспрессией изоформы А или изоформы С, слитых с меткой FLAG. С использованием антител к FLAG-метке мы детектировали специфичное повышение уровня экспрессии как изоформы А, так и изоформы С миозина 1C при добавлении доксициклина. Далее для удобства линии обозначили следующим образом: линия РС-3 с нокдауном изоформы А — si_MYO1C_isoA, линия с нокдауном изоформы С миозина 1C — si_MYO1C_isoC, линия LNCaP с индуцибельной гиперэкспрессией изоформы А — FLAG-Myo1C-isoA, линия с индуцибельной гиперэкспрессией изоформы С — FLAG-Myo1C-isoC.

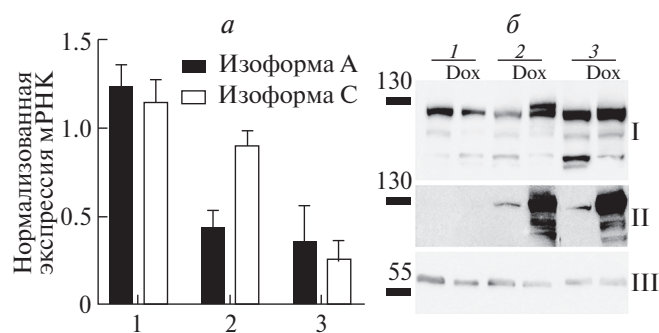


Рис. 1. Экспрессия изоформ миозина 1C в модельных клеточных линиях. *a* – уровень экспрессии мРНК изоформ А и С миозина 1C в контроле (1), при добавлении миРНК к изоформе А миозина 1C (2) и при добавлении миРНК к изоформе С миозина 1C (3). Показаны средние и стандартные отклонения, данные нормализованы по референтным генам *YWHAZ*, *GAPDH* и *HPRT1*; приведено 5 независимых экспериментов. *б* – экспрессия изоформ А и С миозина 1C в клетках LNCaP в контроле и при добавлении доксициклина (Dox). I – окрашивание антителами к пан-миозину 1C, II – окрашивание антителами к метке FLAG, III – окрашивание антителами к α -тубулину; 1 – контроль, 2 – линия FLAG-Myo1C-isoA, 3 – линия FLAG-Myo1C-isoC.

Основные параметры клеточной линии PC-3 в норме и при сниженной экспрессии миозина 1C

Оценка основных параметров пролиферации и клеточной гибели в модельной клеточной линии рака предстательной железы PC-3 и ее модификациях проводилась методом проточной цитометрии. Для оценки распределения по фазам клеточного цикла было проведено стандартное окрашивание йодидом пропидия. Оценка распределения по фа-

зам клеточного цикла позволила выявить достоверные различия между исходной культурой PC-3 и при подавлении изоформы С: количество клеток в G0/G1 фазе было достоверно снижено, а количество клеток в S фазе было достоверно повышено в линии si_MYO1C_isoC. При нокдауне изоформы А в линии si_MYO1C_isoA мы детектировали достоверное увеличение популяции sub G1, включающей в себя гиподиплоидные клетки и апоптотические клетки с деградировавшей ДНК (рис. 2, *a*).

Для анализа пролиферативного потенциала клеточной линии PC-3 и ее модификаций было проведено окрашивание на маркер пролиферирующих клеток Ki-67 (рис. 2, *б*).

В контрольной культуре PC-3 Ki-67+ клетки составили $2.93 \pm 1.07\%$; в культуре si_MYO1C_isoC – $6.10 \pm 0.46\%$; в культуре PC-3 si_MYO1C_isoA – $3.28 \pm 0.21\%$. Процент пролиферирующих клеток был достоверно повышен в клетках с нокдауном изоформы С по сравнению с нокдауном изоформы А. Анализ спонтанной клеточной гибели (рис. 2, *в*) показал, что процент живых клеток с высокой интенсивностью флуоресценции TMRE и без окрашивания аннексином V составлял $85.20 \pm 11.01\%$ для контрольной культуры PC-3; $75.80 \pm 4.00\%$ для линии si_MYO1C_isoC и $76.40 \pm 1.41\%$ для линии si_MYO1C_isoA. Различия в представленности всех выделяемых популяций живых и гибнущих клеток не были достоверны. Таким образом, нокдаун миозина 1C и отдельно его изоформы А не влияет на процесс спонтанной клеточной гибели в культуре PC-3. Однако нокдаун изоформы С миозина 1C активирует пролиферативную активность клеток PC-3: больше клеток по сравнению с контролем входят в S фазу и больше клеток несут маркер Ki-67 по сравнению с нокдауном отдельной изоформы А.

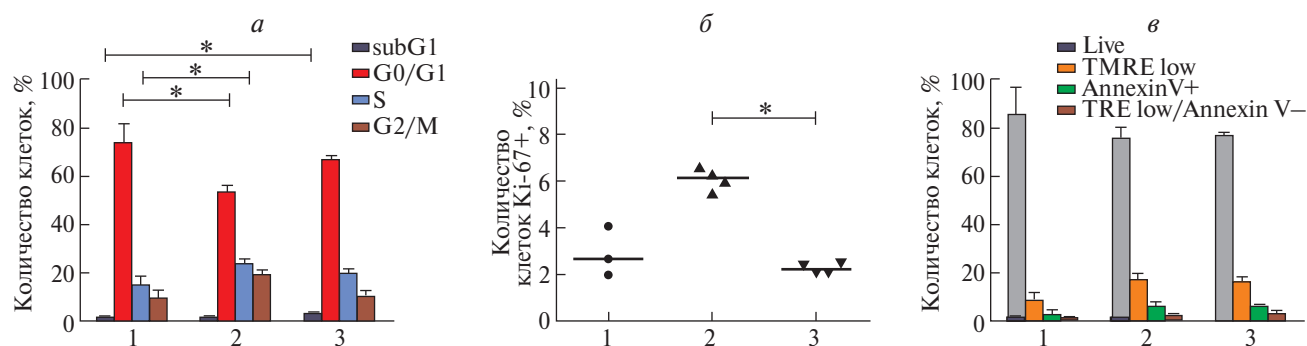


Рис. 2. Основные параметры пролиферации и клеточной гибели в клеточной линии рака простаты PC-3 в контроле (1), при подавлении экспрессии изоформы А миозина 1C (2) и при подавлении экспрессии изоформы С миозина 1C (3). *a* – гистограммы распределения клеток по клеточному циклу. *б* – представленность Ki-67+ клеток в образцах. *в* – гистограммы распределения клеток по стадиям клеточной гибели. Приведено 3 независимых эксперимента, * – достоверные различия между группами, $p < 0.05$, тест Краскелла-Уоллиса, пост-тест Данна.

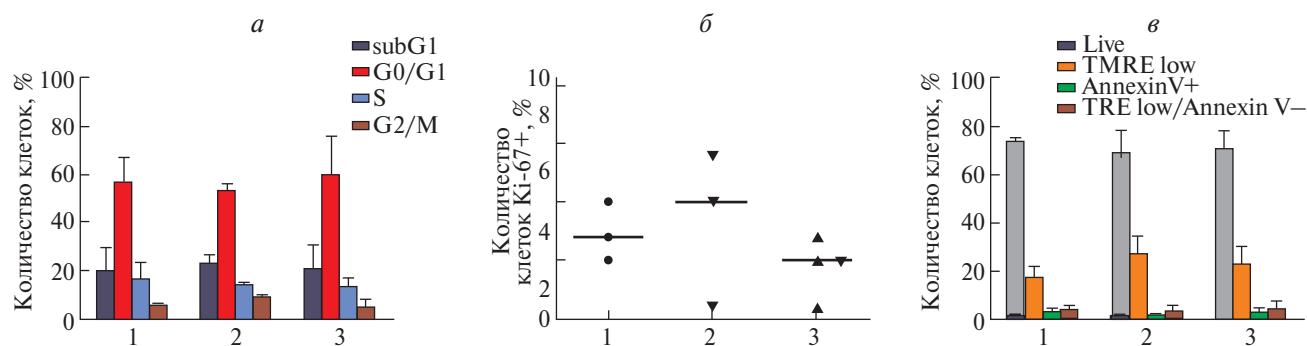


Рис. 3. Основные параметры пролиферации и клеточной гибели в клеточной линии рака простаты LNCaP 3 в контроле (1), при гиперэкспрессии изоформы А миозина 1С (2) и при гиперэкспрессии изоформы С миозина 1С (3). *а* – гистограммы распределения клеток по клеточному циклу. *б* – представленность Ki-67+ клеток в образцах. *в* – гистограммы распределения клеток по стадиям клеточной гибели. Приведено 3 независимых эксперимента, * – достоверные различия между группами, $p < 0.05$, тест Краскелла–Уоллиса, пост-тест Данна.

Основные параметры клеточной линии LNCaP в норме и при индуцированной экспрессии миозина 1С.

Оценка основных параметров пролиферации и клеточной гибели в линии рака предстательной железы LNCaP и ее модификациях проводилась методом проточной цитометрии. Окрашивание йодидом пропидия на распределение по фазам клеточного цикла не показало достоверных различий между исходной культурой LNCaP и ее модификациями (рис. 3, *а*).

Количество Ki-67+ клеток составило $0.73 \pm 0.25\%$ для контрольной культуры LNCaP; $0.83 \pm 0.67\%$ – для культуры LNCaP FLAG-Myo1C-isoC; $0.43 \pm 0.31\%$ – для культуры LNCaP FLAG-Myo1C-isoA. Достоверных различий в количестве пролиферирующих клеток между экспериментом и контролем обнаружено не было (рис. 3, *б*). Анализ спонтанной клеточной гибели в контрольной культуре LNCaP и ее модификациях (рис. 3, *в*) показал, что процент живых клеток составлял $74.47 \pm 0.90\%$ в контроле, $69.07 \pm 9.66\%$ для культуры LNCaP FLAG-Myo1C-isoC и $70.90 \pm 6.99\%$ для линии FLAG-Myo1C-isoA. Различия в представленности всех выделяемых популяций живых и гибнущих клеток не были достоверны. Таким образом, индуцированная экспрессия изоформ миозина 1С не влияет на процессы клеточной пролиферации и спонтанной клеточной гибели в культуре LNCaP.

Мы показали, что изменение уровня экспрессии миозина 1С как в большую, так и в меньшую сторону не влияет на процент спонтанно гибнущих клеток в линиях рака простаты. На данный момент известно небольшое количество работ, посвященных связи миозина 1С и различных вариантов клеточной гибели. Так, отсутствие функционального миозина 1С приводит к нарушению процесса аутофагии; этот процесс, по всей видимости, связан

с участием миозина 1С в правильном функционировании везикулярного компартмента клетки [17].

Неконтролируемая пролиферация клеток является одним из основных признаков онкотрансформации [18]; при этом для разных подтипов рака простаты и опухолей в целом индукция пролиферативной активности может происходить разными способами. Известно, что увеличение пролиферативной активности может достигаться за счет повышения экспрессии рецепторов факторов роста или презентации рецепторов на поверхности клетки; за счет мутаций, которые приводят к конститутивной активации сигнальных путей факторов роста; из-за нарушения механизмов, контролирующих пролиферацию, а также за счет изменений, затрагивающих нарушения процесса контактного торможения [19]. Поскольку миозин 1С участвует в регуляции везикулярного транспорта и экзоцитозе трансмембранных белков, он может оказывать влияние на презентацию рецепторов факторов роста на поверхности клетки [20]. Кроме того, миозин 1С участвует в создании и поддержании межклеточной адгезии, а значит, подавление его экспрессии может привести к нарушению контактного торможения эпителиальных клеток [6].

Мы показали, что снижение уровня экспрессии изоформы С миозина 1С ведет к повышению пролиферативной активности клеток культуры PC-3, при этом достоверно больше клеток оказывается в S – фазе клеточного цикла. В то же время нокдаун только изоформы А не влияет на пролиферативную активность, однако приводит к достоверно большему накоплению клеток в sub-G1 фазе, что свидетельствует о важности этой изоформы для выживания опухолевых клеток.

БЛАГОДАРНОСТИ

Проточный флуориметр-сортер FACSria SORP входит в список приборов Программы развития МГУ.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 22-24-00714).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Greenberg M., Lin T., Goldman Y., et al. Myosin IC generates power over a range of loads via a new tension-sensing mechanism // PNAS. 2012. E2433–40.
2. Bond L., Brandstaetter H., Kendrick-Jones J., et al. Functional roles for myosin 1c in cellular signaling pathways // Cellular signalling. 2013. V. 25. P. 229–235.
3. Ihnatovych I., Migocka-Patrzalek M., Dukh M., et al. Identification and characterization of a novel myosin 1c isoform that localizes to the nucleus // Cytoskeleton. 2012. V. 69. P. 555–565.
4. Pestic-Dragovich L., Stojiljkovic L., Philimonenko A., et al. A myosin I isoform in the nucleus // Science. 2000. V. 290. P. 337–341.
5. Schwab R., Ihnatovych I., Yunus S., et al. Identification of signals that facilitate isoform specific nucleolar localization of myosin IC. // Exp Cell Res. 2013. V. 319. P. 1111–1112.
6. Tokuo H., Coluccio LM. Myosin-1c regulates the dynamic stability of E-cadherin-based cell-cell contacts in polarized Madin-Darby canine kidney cells. // Mol Biol Cell. 2013. V. 24. P. 2820–2833.
7. Arif E., Wager M., Johnstone D. et al. Motor protein Myo1c is a podocyte protein that facilitates the transport of slit diaphragm protein Neph1 to the podocyte membrane // Molecular and cellular biology. 2011. V. 31. P. 2134–2150.
8. Diefenbach T., Latham Vol., Yimlamay D. et al. Myosin 1c and myosin IIB serve opposing roles in lamellipodial dynamics of the neuronal growth cone // J Cell Biol. 2002. V. 158. P. 1207–1217.
9. Bose A., Robida S., Furciitti P. et al. Unconventional myosin Myo1c promotes membrane fusion in a regulated exocytic pathway // Mol Cell Biol. 2004. V. 24. P. 5447–5458.
10. Stauffer E., Scarborough J., Hirono M. et al. Fast adaptation in vestibular hair cells requires myosin-1c activity // Neuron. 2005. V. 47. P. 541–553.
11. Ihnatovych I., Sielski N., Hofmann W. Selective expression of myosin IC Isoform A in mouse and human cell lines and mouse prostate cancer tissues // PlosOne. 2014. V. 9. P. e108609.
12. Saidova A., Potashnikova D., Tvorogova A. et al. Specific and reliable detection of Myosin 1C isoform A by RTqPCR in prostate cancer cells // Peer J. 2018. V. 6. P. e5970.
13. Saidova A., Potashnikova D., Tvorogova A. et al. Myosin 1C isoform A is a novel candidate diagnostic marker for prostate cancer // Plos One. 2021. V. 16. P. e0251961.
14. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes // Genome Biol. 2002. V. 3. P. research0034.1.
15. Potashnikova D., Golyshev S., Penin A. et al. FACS Isolation of Viable Cells in Different Cell Cycle Stages from Asynchronous Culture for RNA Sequencing // Methods Mol Biol. 2018. V. 1745. P. 315–335.
16. Potashnikova D., Saidova A., Tvorogova A. et al. Non-linear Dose Response of Lymphocyte Cell Lines to Microtubule Inhibitors // Front Pharmacol. 2019. V. 10. P. 436.
17. Brandstaetter H., Kishi-Itakura C., Tumbarello D., et al. Loss of functional MYO1C/myosin 1c, a motor protein involved in lipid raft trafficking, disrupts autophagosome-lysosome fusion // Autophagy. 2014. V. 10. P. 2310–2323.
18. Hanahan D., Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation // Cell. 2011. V. 144. P. 646–674.
19. Ouderkirk J., Krendel M. Non-muscle myosins in tumor progression, cancer cell invasion, and metastasis // Cytoskeleton. 2014. V. 71. P. 447–463.
20. Tiwari A., Jung J., Inamdar S. et al. The myosin motor Myo1c is required for VEGFR2 delivery to the cell surface and for angiogenic signaling // Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2013. V. 304. P. H687–H696.

PARAMETERS OF CELL DEATH AND PROLIFERATION OF PROSTATE CANCER CELLS WITH ALTERED EXPRESSION OF MYOSIN 1C ISOFORMS

**E. S. Solomatina^a, E. N. Nishkomaeva^a, A. V. Kovaleva^{a,b}, A. V. Tvorogova^c,
D. M. Potashnikova^a, A. A. Saidova^{a,b, #}**

^a*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^b*Lomonosov Moscow State University. Faculty of Biology, Moscow, Russian Federation*

^c*A. N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology MSU, Moscow, Russian Federation*

[#]*E-mail: saidova@mail.bio.msu.ru*

Presented by Academician of the RAS S.G. Georgiava

Myosin 1C is a monomeric myosin motor with a truncated tail domain. Such motors are referred as slow “tension sensors”. Three isoforms of myosin 1C differ in short N-termed amino acid sequences, the functional differences between isoforms have not been elucidated. Myosin 1C isoform A has been described as a diagnostic marker for prostate cancer, but its role in tumor transformation remains unknown. Based on data on the functions of myosin 1C, we hypothesized the potential role of myosin 1C isoforms in maintaining the tumor phenotype of prostate cancer cells. In our work, we showed that a decrease in the expression level of myosin 1C isoform C leads to an increase in the proliferative activity of prostate tumor cells.

Keywords: myosin 1C, isoforms, prostate cancer, proliferation