

# МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНОГО КАННИБАЛИЗМА И ГИПОТЕЗЫ О ЕГО РОЛИ В ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ

Мамичев И.А.

НИИ ЭДнТО ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

*Mamichev99@gmail.com*

*Клеточный каннибализм - процесс поглощения клеток другими клетками, преимущественно опухолевыми, служит маркером злокачественных опухолей. В данном обзоре представлены основные гипотезы о роли данного процесса в опухолевой прогрессии и приведены известные молекулярные механизмы, приводящие к появлению подобных структур.*

## 1. История открытия клеточного каннибализма и его морфологические особенности

Первое упоминание о феномене «клетка в клетке» датируется 1862 годом, когда J. Eberth обнаружил лимфоцит внутри клетки кишечного эпителия [Eberth, 1864]. Последующие наблюдения подтвердили существование подобных структур в ряде опухолей. В 1925 году Lewis экспериментально показал жизнеспособность поглощенных клеток в культуре, дав повод говорить о совершенно новом клеточном процессе, отличном от фагоцитоза [Lewis, 1925]. В широком смысле клеточный каннибализм характеризуется рядом морфологических особенностей: «съеденная» клетка содержится внутри крупной вакуоли, а ядро клетки-каннибала сдвинуто к периферии и, как правило, принимает серповидную форму.

## 2. Современная классификация клеточного каннибализма

Структуры типа «клетка в клетке» часто подразделяют на два типа: гомотипические и гетеротипические. В ходе гомотипического взаимодействия клетка-мишень поглощается клеткой того же типа, в ходе гетеротипического – клеткой другого типа [Overholtzer and Brugge, 2008]. В гетеротипические взаимодействия могут быть вовлечены как нормальные, так и неопластические клетки. Термин «Клеточный каннибализм» в узком смысле применяется для описания процесса, при котором одна опухолевая клетка активно поглощает другую. Также существуют данные о способности опухолевых клеток поглощать клетки других типов – нейтрофилы, лимфоциты и эритроциты. Клеточный каннибализм служит маркером злокачественных опухолей человека – характерные структуры присутствуют в метастазирующих очагах *in vivo*. Подчеркнем, что термин «Клеточный каннибализм» используется в литературе исключительно для описания опухолевых клеток. Для формирования каннибалической вакуоли требуется механизм, основанный на взаимодействии кавеолина-1, эзрина и актина. Ингибирование любого из этих участников приводит к потере опухолевыми клетками каннибалической активности [Lugini et al., 2006; Fais, 2007].

Термин «энтоз», образованный от греческого *entos* – внутри, применяется, когда идет процесс гомотипического внедрения эпителиальной клетки в соседнюю, причем речь может идти как о нормальных, так и об опухолевых клетках. Еще одно отличие энтоза от клеточного каннибализма – активное участие поглощаемой клетки в процессе внедрения. Механизм энтоза тесно связан с потерей эпителиальными клетками связи с внеклеточным матриксом. Обычно в этой ситуации клетки вступают в апоптоз. В ходе энтоза поглощается живая клетка, открепившаяся от внеклеточного матрикса. Поглощенная клетка остается живой на протяжении некоторого времени (до 48 часов *in vitro*) и гибнет посредством лизосом – опосредованной деградации. Также поглощенная клетка может вступать в митоз, находясь внутри клетки – каннибала. Иногда (около 10% энтозов в культуре MCF10A) она покидает вакуоль и выживает. *In vitro* данный феномен описан для многих клеточных линий, включая клетки эпителия молочной железы (MCF-10A, HMEC),

клетки карциномы молочной железы (MCF-7, SUM52, SUM225), клетки почки эмбриона человека (HEK293) и клетки эпидермоидной карциномы (A431). *In vivo* большинство энтозов выявляется у онкологических больных в жидких экссудатах и моче, что подтверждает связь энтоза с откреплением от внеклеточного матрикса. Молекулярные механизмы энтоза будут рассмотрены ниже. Основные процессы – Rho-ROCK сигналинг и сократительная сила, обусловленная взаимодействием актина с миозином-II [Overholtzer et al., 2007].

Термин «Эмпериоплез» был предложен в 1956 году для описания внедрения гемопоэтических клеток в мегакариоциты, моноциты, фибробласты и некоторые другие клетки. Значение эмпериоплеза во многом остается неясным. Когда лимфоциты связываются с клетками-мишенями, например с эндотелием, они распознают молекулы клеточной адгезии на мембране клеток-мишеней. Методом трансмиссионной электронной микроскопии удалось установить, что плазматическая мембрана НК клетки связана с мембраной клетки – мишени адгезионными контактами. Исследования этого взаимодействия выявили отдельных участников – белки LFA-1, ICAM-1, ICAM-2, CD62L и sLewis A. Уничтожение клетки-мишени НК клеткой регулируется эзрином – белком-линкером между актиновым цитоскелетом и плазматической мембраной [Xia et al., 2008]. Есть данные, согласно которым фосфорилирование эзрина опухолевых клеток стимулирует её к поглощению НК-клеток, которые уничтожают мишень изнутри. Rho-ROCK сигнальный каскад также необходим для эмпериоплеза [Yang and Li, 2012].

Эмперицитоз – гибель цитотоксического Т-лимфоцита, поглощенного опухолевой клеткой по механизму энтоза [He et al., 2013]. Причина, по которой авторы выделяют эмперицитоз в отдельную группу, заключается в активности гранзима В или фрагментина – протеазы, которая в норме запускает апоптоз в клетке-мишени цитотоксического Т-лимфоцита. Оказавшись внутри опухолевой клетки, Т-киллер экспрессирует фрагментин, который не может выйти за пределы энтозной вакуоли и стимулирует вступление в апоптоз самого Т-киллера [Salvesen, 2014].

### **3. Отличия энтоза от фагоцитоза**

Фагоцитоз, достаточно изученный еще к моменту открытия Льюиса, представляет собой процесс поглощения мертвых, гибнущих или патологически измененных клеток макрофагами или гранулоцитами [Aderem and Underhill, 1999]. У некоторых животных фагоцитировать могут ооциты, плацентарные клетки, клетки, выстилающие полость тела, пигментный эпителий сетчатки глаза. Поглощаемые клетки быстро перевариваются лизосомными ферментами. Новый процесс, описанный учеными, включал ряд принципиальных отличий от фагоцитоза. Клетки-каннибалы не относятся к клеткам, в норме осуществляющим фагоцитоз. Энтоз предполагает образование адгезионных контактов между взаимодействующими клетками, внедряющаяся клетка сама активно участвует в процессе, а попав в энтозную вакуоль, может еще некоторое время продвигаться по клеточному циклу. Молекулярные механизмы, лежащие в основе энтоза, отличаются от таковых в фагоцитозе. Оверхольцер сравнивает энтоз с внедрением в клетки млекопитающих одноклеточных паразитов – представителей типа Apicomplexa, подчеркивая роль цитоскелета внедряющейся клетки [Overholtzer et al., 2007].

### **4. Роль внедрения клеток в поддержании гомеостаза организма**

В обзорах, посвященных внедрению клеток друг в друга исследуемый феномен все чаще рассматривается не только в контексте опухолевого роста и метастазирования, но и как более фундаментальный процесс, необходимый для нормального функционирования организма и развития определенных тканей. Внедрение клеток можно считать эволюционно консервативным процессом, причем существует несколько различных молекулярных механизмов приводящих к внедрению [He et al., 2013]. По-видимому, энтоз и клеточный каннибализм, наблюдаемые в злокачественных опухолях, являются

результатом спонтанного включения соответствующих генетических программ, а не возникающим *de novo* феноменом.

Рассмотрим несколько примеров внедрения клеток в здоровом организме и при патогенезе, не связанном с опухолевой трансформацией. *In vivo* клетки гемопоэтического ряда (чаще всего лейкоциты) внедряются в клетки самых разных типов, включая эпителиальные, мезенхимные, нервные и другие. Лейкоциты должны проникать в различные ткани организма и свободно перемещаться через стенки кровеносных и лимфатических сосудов. Существует несколько способов пройти через эндотелий, один из них – проникновение сквозь цитоплазму эндотелиальной клетки [Marchesi and Gowans, 1964]. Такой механизм требует наличия на поверхности лейкоцита нескольких ключевых рецепторов, включая интегрин LFA-1, который связывается с молекулой ICAM1 на поверхности эндотелиоцита [Millan et al., 2006]. За этим взаимодействием следует проникновение лейкоцита внутрь эндотелиальной клетки через кавеолу. Итак, наблюдая за миграцией лейкоцитов через стенку сосуда иногда можно зарегистрировать временные образования типа «клетка в клетке».

Один самых частых случаев гетеротипического внедрения одной клетки в другую наблюдается в костном мозге: нейтрофилы, покидая костный мозг, могут проходить сквозь мегакариоциты. Лабораторные животные, подвергнутые сублетальному облучению или испытавшие крупную кровопотерю, демонстрируют повышенный уровень нейтрофилов и других клеток крови, внедрившихся в мегакариоциты. Сходные данные получены и для людей – пациентов, потерявших много крови. В данном случае наблюдаемый эмпериполез объясняется интенсивным выходом гемопоэтических клеток из костного мозга в ответ на стресс, и возросшей потребностью организма в этих клетках [Bobik and Dabrowski, 1995]. При кровопотере продукция тромбоцитов увеличивается, а мегакариоциты собираются вблизи эндотелия, иногда даже внедряясь в него, чтобы обеспечить доставку тромбоцитов и кровяное русло. На конечных этапах дифференцировки мегакариоцитов организуется демаркационная мембранная система, которая разделяет цитоплазму мегакариоцитов на отдельные тромбоцитарные участки. Путь мигрирующих нейтрофилов в этом случае проходит как раз через демаркационную систему мегакариоцитов, что объясняет наблюдаемый эмпериполез.

Внедрение нейтрофилов в мегакариоциты также характерно для больных, страдающих хроническим идиопатическим миелофиброзом (СМ - chronic idiopathic myelofibrosis) или синдромом «серых тромбоцитов (GPS – gray platelet syndrome) [Schmitt et al., 2000].

Итак, процесс гетеротипического внедрения одной клетки в другую характерен для нормально функционирующих тканей, часто сопровождая процессы миграции кроветворных клеток. Встречаемость характерных структур учащается при определенных нарушениях, связанных с перераспределением адгезивных молекул [Overholtzer and Brugge, 2008].

## 5. Внедрение клеток в канцерогенезе

Клетки многих опухолей обнаруживают способность к гетеротипическому каннибализму; в качестве примера такого процесса можно привести взаимодействие между клеткой меланомы и Т-лимфоцитом. Для того чтобы поглотить лимфоцит клетке меланомы требуется наличие кавеол (небольших инвагинаций плазматической мембраны 50-100 нм, богатых холестерином и кавеолином-1) и белка эзрина, содержащего FERM – домен, который служит линкером между трансмембранными белками и цитоскелетом. Обязательное наличие кавеол, а также ряд общих белков-участников (LFA-1, ICAM и эзрин) роднят этот процесс с трансэндотелиальной миграцией лейкоцитов.

Гомотипические взаимодействия также широко распространены во многих опухолях. Чаще всего поглощения опухолевых клеток соседями, принадлежащими к тому же клеточному типу, наблюдаются в жидких экссудатах: плевральной жидкости и асцитах, содержащих метастазирующие клетки карциномы или злокачественной мезотелиомы. Механизм, запускающий формирование подобных структур, стал более понятен благодаря

методу клеточных культур. Было установлено, что потеря связи с внеклеточным матриксом индуцирует появление клеток-каннибалов в самых разных клеточных линиях, включая эпителиальные клетки млекопитающих. Таким образом, возникло предположение, что потеря обусловленной интегринными клеточной адгезии может служить причиной формирования энтозных структур в ряде опухолей [Overholtzer and Brugge, 2008].

## 6. Молекулярные механизмы энтоза

### 6.1. Открепление от внеклеточного матрикса

#### 6.1.1. Анойкис, аутофагия и некроз в просвете альвеолы молочной железы

Механизм энтоза связан с откреплением от внеклеточного матрикса. Гомотипический каннибализм, частным случаем которого является энтоз, широко распространен во многих опухолях. Чаще всего поглощения опухолевых клеток соседями, принадлежащими к тому же клеточному типу, наблюдаются в жидких экссудатах: плевральной жидкости и асцитах, содержащих метастазирующие клетки карциномы или злокачественной мезотелиомы. *In vitro* потеря контакта с внеклеточным матриксом индуцирует появление клеток-каннибалов в самых разных клеточных линиях, включая эпителиальные клетки млекопитающих [Overholtzer and Brugge, 2008]. Связь с внеклеточным матриксом очень важна для морфогенеза любых трубчатых желез, в частности молочных. В ходе развития молочных желез, клетки, связанные с базальной мембраной выживают, а клетки, оказавшие в центре – гибнут по механизму апоптоза, в результате чего образуется полая структура. Апоптоз может запускаться как через рецептор-зависимый сигнальный путь с участием рецептора FAS и его лиганда FASL, так и через митохондриальный путь, сопровождающийся выходом цитохрома С. Гибель клеток, опосредованная откреплением от внеклеточного матрикса называется анойкис. Этот процесс служит барьером для развития опухолей и препятствует метастазированию. Установлено, что анойкис эпителиальных клеток в протоках молочной железы человека запускается после утраты Akt-сигнального пути, который активен в клетках, прикрепленных к базальной мембране благодаря работе трех белков, непосредственно связанных с интегрином: FAK, Shc и ILK [Frisch and Screaton, 2001; Kim et al., 2012]. Akt ингибирует посредством фосфорилирования ряд проапоптотических белков (в частности Bad), подавляет экспрессию проапоптотических генов и поддерживает митохондриальный гомеостаз, стимулируя усвоение глюкозы и гликолиз, тем самым способствуя выживанию клеток. Также в протоках молочных желез происходит ингибирование белков семейства Rb, в результате которого активируются транскрипционные факторы E2F, стимулирующие вступление в апоптоз [Debnath et al., 2002]. Еще одним фактором, регулирующим апоптоз в просвете железы, являются рецепторы тирозин киназы. Клетки MCF-10A и MCF-7 могут избежать анойкиса за счет экспозиции большого числа этих рецепторов на поверхность мембраны [Guadamillas et al., 2011]. Методом трехмерного культивирования показано, что гиперэкспрессия одного из этих рецепторов - ErbB2, приводит к заселению люминального отдела эпителиальными клетками за счет ускорения их пролиферации и блокирования клеточной гибели [Muthuswamy et al., 2001]. Однако анойкис – не единственный механизм удаления клеток из просвета молочной железы. Ишемия и недостаток глюкозы стимулируют аутофагию в клетках, не связанных с базальной мембраной, что повышает их выживаемость. Нарушения аутофагии приводят к ускоренной апоптотической гибели этих клеток, и, по-видимому, при морфогенезе нормальной молочной железы аутофагия угнетена. С другой стороны, в некоторых случаях аутофагия ускоряет опухолевый рост, так как при одновременном блокировании апоптоза и аутофагии происходит накопление в клетках убиквитинированных и поврежденных белков, что может привести к повреждению ДНК и геномной нестабильности. К примеру, в культуре карциномы молочной железы MCF-7 аутофагия угнетена из-за утраты одного аллеля гена Beclin-1, необходимого для формирования аутофагосомы [Karantza-Wadsworth et al., 2007]. При нокадауне BIM – одного из ключевых факторов апоптоза, в протоках молочных желез,

запускается компенсаторная программа клеточной гибели, независимая от каспаз. Авторы установили, что открепление от внеклеточного матрикса приводит к увеличению в клетке активных форм кислорода, и гибель осуществляется по механизму некроза [Mailleux et al. 2007]. Итак, для метастазирования в проток молочной железы, трансформированной клетке нужно обладать набором мутаций, делающим её невосприимчивой к нескольким видам клеточной гибели. Наблюдаемый в культуре инвазивной карциномы молочной железы MCF-7 энтоз Оверхольцер и коллеги называют ещё одним механизмом клеточной гибели, связанным с откреплением от внеклеточного матрикса и специфичным для опухолевых клеток эпителиального происхождения [Overholtzer and Brugge, 2008]. В действительности, энтоз в опухолях *in vivo* чаще связан с неблагоприятным прогнозом, поэтому высказывается предположение о внедрении, как об одной из стратегий избежать апоптоза, опосредованного откреплением от базальной мембраны. Поскольку часть внедрившихся клеток выживает, энтоз из защитного механизма превращается в фактор, способствующий опухолевому росту [Guadamillas et al. 2011].

#### 6.1.2. Утрата апико-базальной полярности

Базальная мембрана альвеол молочной железы богата коллагеном IV и ламинином. В клетках существует четкая апико-базальная полярность, что подтверждается характерным распределением маркеров полярности ZO-1, E-кадгерина и интегрин  $\alpha\beta 4$  [Mailleux et al. 2007]. На ранних стадиях канцерогенеза происходит утрата полярности и инвазия клеток в просвет альвеолы. Механизмы, запускающие энтоз и значение апико-базальной полярности стали более понятны благодаря методу клеточных культур, в частности трехмерному культивированию. При посеве клеток MCF-10A на матригеле, они организуются в трубчатые структуры, напоминающие альвеолы, приобретают апико-базальную полярность и *de novo* синтезируют компоненты базальной мембраны [Debnath et al., 2002; Vahidnezhad et al., 2009]. Также в «альвеолах» экспрессируются тканеспецифичные белки молока. Клетки MCF-7 при культивировании в аналогичных условиях не образуют упорядоченных структур, если не провести предварительного ингибирования  $\beta 1$ -интегрин, гиперэкспрессия которого характерна для данной культуры.  $\beta 1$ -интегрин и его эффектор – фосфатидилинозитол-3-киназа (PIP3) запускают разветвленный сигнальный каскад, одна из «ветвей» которого приводит к активации Akt, а другая – к активации Ras1 и снижению полярности [Vahidnezhad et al., 2009]. На роль утраты полярности в индукции энтоза косвенно указывает эксперимент на культуре MDCK. Для энтоза важно актин-миозиновое сокращение по периферии межклеточного контакта. Молекулярные механизмы, регулирующие активацию миозина, пока не до конца изучены. Группа ученых, работающих на культуре MDCK, выявила роль двух белков, влияющих на активацию миозина II при образовании межклеточных контактов: Par3 и Lgl1/2, которые относятся к группе белков «полярности». Эти белки обуславливают разделение мембраны на базо-латеральную и апикальную части. В ходе экспериментов по изменению экспрессии Par3 и Lgl1/2 исследователи столкнулись с интересным феноменом – внедрением клеток друг в друга и активацией Rho-ROCK сигнального каскада. Внедрившаяся клетка впоследствии гибла, не демонстрируя при этом маркеров апоптоза. Наблюдаемое явление было неотличимо от энтоза. Исследуемые белки оказались антагонистами. В то время как гиперэкспрессия Lgl1/2 и блокирование Par3 приводит к активации миозина II, нокаут Lgl1/2 оказывает обратный эффект. Данные белки непосредственно взаимодействуют с плазматической мембраной, поэтому авторы выдвинули предположение, что Par3 и Lgl1/2 влияют, прежде всего, на состояние кортикальной сети актина, а не на пучки микрофиламентов. В результате авторы предложили идею, согласно которой энтоз может запустить не только открепление от внеклеточного матрикса, но и дисбаланс в регуляции активации миозина и утрата апико-базальной полярности [Wan et al., 2012].

#### 6.1.3. Связь энтоза с эпителиально-мезенхимальным переходом

Не до конца понятна связь энтоза с эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП) – сложным процессом изменения эпителиальными клетками эпителиального фенотипа на мезенхимальный. Оба этих процесса подразумевают открепление от внеклеточного матрикса, блокирование программ, приводящих к апоптозу, и реорганизацию актинового цитоскелета. Некоторые исследователи предполагают, что эпителиально-мезенхимальный переход, приводящий к метастазированию и энтозу – это два конкурирующих механизма, связанные с откреплением от внеклеточного матрикса. Энтозные структуры обнаруживаются в биоптатах пациентов на поздних стадиях рака предстательной железы. Сигнальный путь, запускаемый взаимодействием андрогена с рецептором, приводит к индукции энтоза посредством включения Rho-ROCK каскада. В теории, стимулирование энтоза может снизить риск метастазирования, поскольку открепившиеся клетки будут элиминированы [Wen et al., 2013; Wen et al., 2014]. Группа ученых, исследующих клеточный каннибализм в аденокарциноме поджелудочной железы, обнаружила механизм переключения между двумя фенотипами: агрессивным мигрирующим (ЭМП) и каннибалическим. Изучив 36 образцов биоптата пациентов и их истории болезни, ученые пришли к выводу, что наличие в ткани опухоли клеток-каннибалов существенно снижает риска метастазирования. Обычно в опухолевых клетках TGF $\beta$  запускает экспрессию Nupr1, который, в свою очередь, отвечает за ЭМП. Авторы провели ряд экспериментов на культуре Panc-1. В контрольной популяции в ответ на повышение уровня TGF $\beta$  клетки изменили фенотип, осуществив ЭМП. При нокдауне Nupr1 и последующем повышении уровня TGF $\beta$  в культуре клетки начали поглощать своих соседей, формируя характерные структуры - «клетка в клетке». Связываясь с промоторами генов CDC42 и CXCL1 (причем механизм связывания с каждым из них различается), Nupr1 блокирует их транскрипцию и не дает клетке дифференцироваться в каннибала. Также на поверхности клеток Panc-1, способных к каннибализму, экспрессировался ряд фагоцитарных маркеров, в том числе CD68. В клетках с инактивированным Nupr1 падала экспрессия генов, отвечающих за ЭМП, и повышалась экспрессия генов, характерных для фагоцитирующих клеток. Стоит, однако, отметить, что молекулярные механизмы, лежащие в основе энтоза, описанного Овергольцером на культуре MCF-7, и клеточного каннибализма в культуре Panc-1 отличаются. Клетки Panc-1 с нокдауном Nupr1 не реагируют на подавление экспрессии E-кадгерина и ROCK1, в то время как для энтоза эти факторы необходимы. Не исключено, что каннибализм в клетках аденокарциномы осуществляется по схожему с энтозом механизму, но с участием других кадгеринов, например N-кадгерина [Cano et al., 2012].

#### 6.2. В процессе энтоза формируются адгезионные контакты

Внедрение поглощаемой клетки в клетку каннибала инициируется образованием межклеточных контактов, что принципиально отличает этот процесс от фагоцитоза. Известно, что эпителиальные клетки формируют адгезионные контакты не только *in vivo*, но и при культивировании в суспензии, [Adams et al., 1998]. Контакты этого типа также важны для энтоза, так как удаление из среды кальция, равно как и прямое блокирование E-кадгерина антителами препятствует энтозу в культурах MCF-7 и MCF-10A [Overholtzer et al., 2007]. *In vivo* клетки - каннибалы, полученные из метастатических экссудатов пациентов с раком молочной железы, обладают тем же фенотипом, что и энтозные клетки в культуре, а именно характерным рисунком при иммуноцитохимическом окрашивании антителами к E-кадгерину и  $\beta$ -катенину. Эти белки локализованы на поверхности обеих клеток, а наибольшие их скопления наблюдаются по краям зоны межклеточного контакта, что говорит об участии адгезионных контактов в формировании данных структур в опухолях человека [Overholtzer and Brugge, 2008].

#### 6.3. Каскад Rho-ROCK, взаимодействие актина с миозином II

Для формирования энтозных структур *in vitro* необходима контракильная сила, обусловленная взаимодействием актина с миозином-II, которое, в свою очередь, запускается малой ГТФазой Rho и её эффекторной киназой ROCK (Rho effector kinase). Малая ГТФаза Rho активируется в ответ на различные внеклеточные стимулы, в том

числе и поступающие от внеклеточного матрикса через интегрины и от адгезионных контактов через кадгерин. Промежуточным звеном в передаче сигнала на малую ГТФазу Rho являются белки семейства GEF (guanine-nucleotide-exchange factors) и GAP (GTPase-activating proteins). Rho запускает множество молекулярных каскадов, наиболее важными эффекторами для индукции энтоза являются ROCK1 и ROCK2. Работа этих белков приводит к фосфорилированию легкой цепи миозина, полимеризации актина и созданию контрактильной силы. Также Rho регулирует работу белков семейства ERM - линкеров между актином и плазматической мембраной,  $Na^+/H^+$  антипорта NHE-1 и белков промежуточных филаментов (десмина, виментина и глиального фибриллярного кислого белка) [Schwartz, 2004]. Роль перечисленных белков в индукции энтоза была доказана их последовательным нокдауном или воздействием ингибиторов, а в случае актина – блокированием его полимеризации. Существуют две изоформы ROCK: ROCK1 и ROCK2. Нокдаун каждой изоформы по отдельности вдвое снижает энтозный индекс, в то время как нокдаун обеих изоформ понижает процент наблюдаемых в культуре MCF-10A энтозов примерно в три раза. Примечателен тот факт, что киназа Rho должна работать именно в поглощаемой клетке для её успешного внедрения [Overholtzer et al., 2007].

#### 6.4. Кислый эндосомный компартмент

Деградация поглощенной клетки связана с работой кислого везикулярного компартмента. Кислый эндосомный компартмент клетки-каннибала представляет собой надежный и постоянно возобновляемый аппарат для переваривания. Его роль в энтозе была доказана с помощью окрашивания клеток MCF-7 по двум лизосомным маркерам: интегральному белку лизосом LAMP1, лизосомной протеазе катепсину В, а также с помощью окрашивания активных лизосом лизотрекером. При нарушении работы лизосом (например, при ингибировании вакуолярной  $H^+$ /АТФазы) процент энтозов не уменьшается, однако поглощенные клетки гибнут по механизму апоптоза [Overholtzer et al., 2007]. Анализ кислого везикулярного компартмента на клетках эпидермоидной карциномы человека A431 показал, что в энтозе участвуют как лизосомы клетки-каннибала, так и лизосомы поглощенной клетки. На первых этапах энтоза лизосомы поглощенной клетки концентрируются в перинуклеарном пространстве. Постепенно их количество возрастает, лизосомы выходят на периферию клетки равномерно в ней распределяются. На поздних стадиях закисляется вся цитоплазма поглощенной клетки. Лизосомы клетки-каннибала также участвуют в процессе, распределяются на периферии энтозной вакуоли и сливаются с ней [Garanina and Savitskaya, 2012]. Оверхольцер и коллеги продемонстрировали, что лизосомы постоянно сливаются и отшнуровываются от каннибалической вакуоли, причем слияние вакуоли с новыми лизосомами происходит и тогда, когда сама вакуоль уменьшается в размерах. Независимо от стадии энтоза, на мембране вакуоли экспрессируется маркер поздних эндосом Rab-7, то есть данная структура является гибридной – с её мембраной сливаются как лизосомы, так и поздние эндосомы. Динамический процесс поступления и ухода лизосом помогает поддерживать мембранный гомеостаз клетки, однако для быстрого распада крупной каннибалической вакуоли, уже переварившей содержимое, этого недостаточно. Было доказано, что в её уменьшении участвует комплекс mTORC1 [Krajcovic et al., 2013].

#### 6.5. Энтоз – механизм клеточной гибели, не связанный с апоптозом

В ранних экспериментах, посвященных изучению механизмов энтоза требовалось доказать, что поглощенная клетка не является апоптотической и этот процесс не аналогичен фагоцитозу апоптотических телец. Оверхольцер и коллеги провели анализ ряда апоптотических и фагоцитарных маркеров. За 12 часов культивирования в суспензии процент клеток, содержащих активную каспазу-3 не изменился, в то время как индекс энтозов увеличился до 25%. Гиперэкспрессия Bcl-2 и воздействие на клетки ингибитором каспазы-3 ZVAD-FMK не повлияли на процесс поглощения клеток. Появление фосфатидилсерина на наружной стороне клетки служит индикатором апоптоза, при этом такие клетки поглощаются фагоцитами. Поглощенные клетки в исследуемой культуре не

экспрессировали на своей наружной мембране фосфатидилсерин. Ингибирование фагоцитоза за счет блокирования выхода PS на наружную сторону липидного бислоя также не оказало эффекта на процесс поглощения. Наконец, исследователи продемонстрировали, что фагоцитоз апоптотических клеток в целом нехарактерен для культуры MCF-10A поскольку при сокультивировании этой линии с апоптотическими клетками Jurkat (лейкемические Т-лимфоциты человека) не наблюдалось поглощения. Все эти данные в совокупности свидетельствуют о том, что механизм энтоза не зависит от апоптотических молекулярных каскадов и не имеет ничего общего с фагоцитозом апоптотических клеток. [Overholtzer et al., 2007]. *In vivo* в раках молочной железы большинство энтозов не содержат активной каспазы-3, что отличает эти клетки от клеток, фагоцитирующих апоптотические тельца. Однако в последние годы появились данные о том, что возможна апоптотическая гибель поглощенных клеток, например при угнетении работы лизосомного компартмента в клетках культуры MCF-7 [Overholtzer et al., 2007]. На клетках каннибалах культуры Panc1 было доказано, что клетка-каннибал и клетка-жертва подвержены апоптотической клеточной гибели (в клетках присутствуют эпителиальные цитокератин 18, модифицированный каспазами). И, хотя каннибализм в культуре Panc1 отличается от энтоза, эти процессы имеют общую черту – в ходе взаимодействия образуются адгезивные контакты [Cano et al., 2012].

## 7. Гипотезы о биологическом значении внедрения клеток

[Overholtzer and Brugge, 2008]

Структуры типа «клетка в клетке» обнаруживаются во многих тканях – нормальных и трансформированных. По-видимому, функции этих структур в физиологии организма и опухолевой прогрессии различны, и их следует рассматривать в контексте микроокружения и типа взаимодействующих клеток.

7.1. Клетки-каннибалы переваривают поглощенные клетки и получают питательные вещества

Многие исследователи предполагают, что процесс клеточного каннибализма функционально аналогичен аутофагии, и служит для питания клетки-каннибала. Таким образом, опухолевые клетки могут поглощать соседние клетки или лимфоциты, чтобы пережить неблагоприятные условия [Lugini et al., 2006; Krajcovic et al., 2013].

7.2. Поглощенные клетки убивают своих «хозяев»

Разрушение клетки-хозяина внедрившейся клеткой изнутри также было описано для разных тканей. К примеру, поглощение лимфоцитов клетками костного мозга или фибробластами *in vitro* часто заканчивается гибелью последних [Sinkovics et al., 1966]. В подобных случаях поглощенные клетки, по-видимому, ведут себя как внутриклеточные паразиты – питаются за счет хозяина и постепенно убивают его. Лимфоциты, культивируемые вместе с фибробластами, в целом живут дольше, чем в чистой культуре. В опухолях эмбриоплез может быть результатом иммунного ответа: лимфоциты способны проникать в опухолевые клетки убивать их изнутри.

7.3. Клетка-хозяин убивает поглощенную клетку.

В данном случае клетка поглощает другую, чтобы уничтожить её. Основываясь на многих исследованиях культур опухолевых клеток можно предположить, что энтоз, вызываемый потерей связи с внеклеточным матриксом, может служить одним из механизмов элиминирования опухолевых клеток, покинувших свою нишу. В пользу этого предположения говорит тот факт, что ингибирование ROCK, необходимой для энтоза, вызывает ускорение пролиферации клеток рака молочной железы (РМЖ) *in vitro* [Overholtzer et al., 2007]. Исследования легочной карциномы *in vitro* и наблюдение за пациентами, страдающими лейкемией [Domingo-Claros et al., 1996] привели к похожим результатам – риск метастазирования ниже в тех опухолях, где встречается энтоз.

7.4. Слияние клеток и геномная нестабильность.

Рассматриваемые взаимодействия между соседними опухолевыми клетками или между гемопоэтическими и опухолевыми клетками могут привести к слиянию двух клеток и



тетраплоидии. Возможно перемешивание генетического материала нормальной и опухолевой клеток, даже представителей разных клеточных типов.

Анеуплоидия – характерная черта опухолевых клеток, часто встречающаяся во многих видах раков человека. Основная причина анеуплоидии – различные патологии митоза. Многие анеуплоидные раковые клетки обладают набором хромосом большим, чем  $2n$ , что дает право предположить, что в ходе опухолевой прогрессии анеуплоидии предшествует полиплоидия. Полиплоидные клетки возникают в результате эндорепликации, слияния клеток и нарушении цитокинеза [Ganem et al., 2007]. Также обнаружено, что причиной полиплоидии может стать энтоз. Таким образом, будучи косвенной причиной анеуплоидии, энтоз усугубляет опухолевую прогрессию.

Полиплоидные клетки, как и энтоз часто встречаются в РМЖ, около половины опухолей молочной железы содержат полиплоидные и анеуплоидные клетки. Причем количество таких клеток, как и энтозов увеличивается по мере прогрессии и малигнизации опухолей. Исследователи доказали, что энтоз вызывает анеуплоидию, нарушая деление клетки. Крупная энтозная вакуоль препятствует формированию контрактильного кольца, в результате чего цитокинез становится невозможным.

Подобные двуядерные структуры, вкпе с потерей необходимых чекпоинтных белков, таких как p53, стимулируют опухолевую прогрессию. Несмотря на то, что большинство потомков такой двуядерной клетки нежизнеспособны, те которые выживают, поддерживают клеточную линию с растущей нестабильностью генома. Двуядерные клетки зачастую содержат удвоенный набор центросом, что приводит к многополюсным митозам и нарушенному расхождению хромосом [Krajcovic and Overholtzer, 2012].

### Список литературы

1. Adams C.L., Chen Y.T., Smith S.J. and Nelson W.J. Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein. *The Journal of Cell Biology*; 1998, vol. 142, no. 4, pp. 1105–1119.
2. Aderem A. and Underhill D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology*; 1999, vol. 17, pp. 593-623.
3. Bobik R. and Dabrowski Z. Emperipolesis of marrow cells within megakaryocytes in the bone marrow of sublethally irradiated mice. *Annals of Hematology*; 1995, vol. 70, no. 2, pp. 91–95.
4. Cano C.E., Sandi M.J., Hamidi T. et al. Homotypic cell cannibalism, a cell-death process regulated by the nuclear protein 1, opposes to metastasis in pancreatic cancer. *EMBO Molecular Medicine*; 2012, vol. 4, no. 9, pp. 964–979.
5. Debnath J., Mills K.R., Collins N.L., et al. The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. *Cell*; 2002, vol. 111, no. 1, pp. 29–40.
6. Domingo-Claros A., Alonso E., Aventin A. et al. Oligoblastic leukaemia with (8;21) translocation and haemophagocytic syndrome and granulocytic cannibalism. *Leukemia. Research*; 1996, vol. 20, no. 6, pp. 517–521.
7. Frisch S.M. and Sreaton R.A. Anoikis mechanisms. *Current Opinion in Cell Biology*; 2001, vol. 13, no. 5, pp.555–562.
8. Ganem N.J., Storchova Z., Pellman D. Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Current Opinion in Genetics and Development*; 2007, vol. 17, no. 2, pp. 157-162.
9. Garanina A.S., Savitskaya M.A. Cell cannibalism in human epidermoid carcinoma A431 cell line. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*; 2013, volume 68, no.1, pp. 5-7.

10. *Guadamillas M.C., Gerez A., Pozo M.A.* Overcoming anoikis – pathways to anchorage-independent growth in cancer. *Journal of Cell Science*; 2011, vol. 124, no. 19, pp. 3189–3197.
11. *He M-f, Wang S., Wang Y., Wang X-n.* Modeling cell-in-cell structure into its biological significance. *Cell Death and Disease*; 2013, vol. 4, e630, doi:10.1038/cddis.2013.147.
12. *Karantza-Wadsworth V., Patel S., Kravchuk O. et al.* Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes and Development*; 2007, vol. 21, no. 13, pp. 1621-1635.
13. *Kim S.E. and Overholtzer M.* Autophagy proteins regulate cell engulfment mechanisms that participate in cancer. *Seminars in Cancer Biology*; 2013, vol. 23, no. 5, pp. 329-336.
14. *Kim Y.N., Koo K.H., Sung J.Y. et al.* Anoikis Resistance: An Essential Prerequisite for Tumor Metastasis. *International Journal of Cell Biology*; 2012, vol. 2012, Article ID 306879, 11 pages, doi:10.1155/2012/306879
15. *Krajcovic M. and Overholtzer M.* Mechanisms of Ploidy Increase in Human Cancers: A New Role for Cell Cannibalism. *Cancer Research*; 2012, vol. 72, no. 7, pp. 1596-1601.
16. *Lewis W.H.* The engulfment of living blood cells by others of the same type. *The Anatomical Record*; 1925, vol 31, no. 1, pp. 43-49.
17. *Lugini L., Matarrese P., Tinari A. et al.* Cannibalism of live lymphocytes by human metastatic but not primary melanoma cells. *Cancer Research*; 2006, vol 66, no. 7, pp. 3629–3638
18. *Mailleux A.A., Overholtzer M., Schmelzle T., et al.* BIM regulates apoptosis during mammary ductal morphogenesis, and its absence reveals alternative cell death mechanisms. *Developmental Cell*; 2007, vol. 12, no. 12, pp. 221–234.
19. *Marchesi V. T. and Gowans J. L.* The migration of lymphocytes through the endothelium of venules in lymph nodes: an electron microscope study. *Proceedings of the Royal Society of London*; 1964, vol. 159, no. 985, pp. 283–290.
20. *Millan J., Hewlett L., Glyn M. et al.* Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nature Cell Biology*; 2006, vol. 8, no. 2, pp. 113–123.
21. *Muthuswamy S.K., Li D., Lelievre S. et al.* ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini *Nature Cell Biology*; 2001, Vol. 3, no. 9, pp. 785-792.
22. *Nishie M., Mori F., Houzen H. et al.* Oligodendrocytes within astrocytes (“emperipolesis”) in the cerebral white matter in hepatic and hypoglycemic encephalopathy. *Neuropathology*; 2006, vol. 26, no. 1, pp. 62–65.
23. *Overholtzer M. and Brugge J.S.* The cell biology of cell-in-cell structures. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*; 2008, vol. 9, no. 10, pp. 796-809.
24. *Overholtzer M., Mailleux A.A., Mouneimne G. et al.* A Nonapoptotic Cell Death Process, Entosis, That Occurs by Cell in Cell Invasion. *Cell*; 2007, vol. 131, no. 5, pp. 966–979.
25. *Portugal J., Mansilla S., Bataller M.* Mechanisms of Drug-Induced Mitotic Catastrophe in Cancer Cells *Current Pharmaceutical Design*; 2010, vol. 16, no. 1, pp. 69-78.
26. *Sahebkhithari H. A. and Tavassoli M.* Marrow cell uptake by megakaryocytes in routine bone marrow smears during blood loss. *Scandinavian Journal of Haematology*; 1976, vol. 16, no. 1, pp. 13–17.
27. *Salvesen G.S.* Dying from within: granzyme B converts entosis to emperitosis *Cell Death and Differentiation*; 2014, vol. 21, no. 1, pp. 3–4.

28. Schmitt A., Jouault H., Guichard J. et al. Pathologic interaction between megakaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis. *Blood*; 2000, vol. 96, no. 4, pp. 1342–1347.
29. Schwartz M. Rho signalling at a glance. *Journal of Cell Science*; 2004, vol. 117, no. 23, pp. 5457-5458.
30. Sharma N. and Dey P. Cell Cannibalism and Cancer. *Diagnostic Cytopathology*; 2010, vol. 39, no. 3, pp. 229-233.
31. Sinkovics J.G., Shullenberger C.C., Howe, C.D. Cell destruction by lymphocytes. *Lancet*; 1966, vol. 287, no. 7448, pp. 1215–1216.
32. Vahidnezhad H., Youssefian L., Tehrani M.J. et al. Modeling Breast Acini in Tissue Culture for Detection of Malignant Phenotype Reversion to Non-Malignant Phenotype. *Iranian Biomedical Journal*; 2009, vol. 13, no. 4, pp. 125-132.
33. Wan Q., Liu J., Zheng Z. et al. Regulation of myosin activation during cell–cell contact formation by Par3-Lgl antagonism: entosis without matrix detachment. *Molecular Biology of the Cell*; 2012, vol. 23, no. 11, pp. 2076–2091.
34. Wen S., Niu Y., Lee S.O., Chang C. Androgen receptor (AR) positive vs negative roles in prostate cancer cell deaths including apoptosis, anoikis, entosis, necrosis and autophagic cell death. *Cancer Treatment Reviews*; 2014, vol. 40, no. 1, 31-40.
35. Wen S., Shang Z., Zhu S. et al. Androgen receptor enhances entosis, a non-apoptotic cell death, through modulation of Rho/ROCK pathway in prostate cancer cells. *Prostate*; 2013, vol. 73, no. 12, pp.1306–1315.
36. White E. Entosis: It’s a Cell-Eat-Cell World. *Cell*; 2007, vol. 131, no. 5, pp. 840-842.
37. Xia P., Wang S., Guo Z., Yao X. Emperipolesis, entosis and beyond: Dance with fate. *Cell Research*; 2008, vol. 18, no. 6, pp. 705-707.
38. Yang Y.Q. and Li J.C. Progress of Research in Cell-in-Cell Phenomena. *The Anatomical Record*; 2012, vol. 295, no. 3, pp. 372–377.