

На правах рукописи

КУЛИКОВА Ксения Валерьевна

**ВЛИЯНИЕ WNT ЛИГАНДОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ ФЕНОТИПА
КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА**

Специальность 03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва

2012

Работа выполнена в лаборатории генной терапии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук.

Научный руководитель: кандидат биологических наук
ЛАРИН Сергей Сергеевич

Официальные оппоненты: САЩЕНКО Лидия Павловна
доктор биологических наук, профессор,
ИБГ РАН, заведующий лабораторией

ТРУБИЦЫНА Ирина Евгеньевна
доктор медицинских наук, профессор,
ГБУЗ ЦНИИГ ДЗГМ, заведующий лабораторией

Ведущая организация: Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится «27» апреля 2012 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 002.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института биологии гена Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Автореферат разослан «26» марта 2012 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
канд. фарм. наук

Грабовская Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

На долю меланомы приходится больше половины всех смертей, спровоцированных злокачественными новообразованиями кожи (Tsao et al., 2004). В основе летальности этого заболевания лежат высокая изменчивость и метастатическая активность клеток опухоли, делающие современные методы ее лечения слабо эффективными.

Метастатическая меланома представляет собой гетерогенное образование. Она содержит несколько популяций клеток, соответствующих различным этапам и направлениям опухолевой прогрессии. Эти популяции отличаются по свойствам, что сильно затрудняет изучение отдельных закономерностей. Имея набор клеточных линий и изучая свойства каждой из них, можно получить представление о совокупности молекулярных процессов, влияющих на формирование опухолевого фенотипа меланомы человека в целом.

Многие процессы, ассоциированные с прогрессией меланомы, подвержены влиянию со стороны компонентов сигнального каскада, активируемого белками семейства Wnt (Weeraratna et al., 2002; Shah et al., 2008; Chien et al., 2009). Белки семейства Wnt способны стимулировать как минимум три различных сигнальных каскада: канонический β -катениновый, неканонический Ca^{2+} -зависимый и неканонический PCP сигнальный путь (Weeraratna, 2005). В период эмбрионального развития белки Wnt регулируют подвижность и дифференцировку предшественников меланоцитов (Dorsky et al., 1998), а во взрослом организме поддерживают гомеостаз самих пигмент продуцирующих клеток. Считается, что нарушение этого гомеостаза приводит к злокачественной трансформации меланоцитов, сопровождающей образование меланомы (Haass and Herlyn, 2005). При меланоме экспрессия генов, кодирующих белки Wnt, часто изменена (Pham et al., 2003; Da Forno et al., 2008).

На настоящий момент не существует однозначного понимания, каким образом сигнальный каскад Wnt участвует в развитии данного онкологического заболевания. Ряд исследований указывает на противоопухолевый эффект канонической ветви Wnt сигнального пути (Chien et al., 2009). При этом, согласно другим данным, чрезмерная активация канонического Wnt сигнального каскада, напротив, ассоциирована со злокачественной трансформацией меланоцитов (Larue et al., 2009). Неканонический Wnt/ Ca^{2+} -зависимый сигнальный каскад способствует метастазированию меланомы (Dissanayake et al., 2007). Однако высокий уровень экспрессии гена неканонического лиганда Wnt5a детектируется не только в метастазирующей меланоме, но и в доброкачественных невусах (Pham et al., 2003).

Таким образом, определение эффектов, оказываемых каноническими и неканоническими Wnt лигандами на активность внутриклеточных сигнальных путей и на поведение клеточных линий меланомы человека, представляет собой крайне

актуальную задачу, решение которой даст ключ к пониманию особенностей развития меланомы в целом.

Цель и задачи исследования

Основной целью работы стало выявление роли различных белков семейства Wnt в формировании опухолевого фенотипа клеточных линий меланомы человека. Для достижения поставленной цели были определены следующие экспериментальные задачи:

1. Определить уровень экспрессии генов маркеров эпителиально-мезенхимального перехода: Slug, Twist1 и Sip1 в клеточных линиях меланомы человека.
2. Исследовать взаимосвязь между активностью канонического Wnt сигнального пути и локализацией β -катенина в имеющемся наборе клеточных линий меланомы человека.
3. Изучить вклад канонических и неканонических Wnt лигандов в формирование фенотипа клеточной линии меланомы человека MelP.

Научная новизна и практическая значимость работы

В работе было показано, что в клеточных линиях меланомы человека MelR, MelG, MelME, MelKsen, MelKis, Mel226, MelIbr, MelIL, MelKor, MelP, MelSi, Mel82 экспрессируются гены базовых маркеров программы эпителиально-мезенхимального перехода (Slug, Twist1 и Sip1), указывая на активированное состояние этой программы в исследованных образцах. Кроме того, было впервые показано, что в клеточных линиях меланомы человека внутриядерная локализация β -катенина не является достаточным условием для активации канонического Wnt сигнального пути. Канонический лиганд Wnt3a в модельной клеточной линии меланомы человека способен активировать два Wnt сигнальных каскада: канонический β -катениновый и неканонический Wnt/ Ca^{2+} -зависимый. Этот лиганд блокирует пролиферацию опухолевых клеток и стимулирует их подвижность. Неканонические лиганды Wnt5a и Wnt11 также способны активировать Wnt/ Ca^{2+} -зависимый сигнальный путь в модельной клеточной линии меланомы человека. При этом Wnt5a влияет на миграционную способность клеток, а Wnt11 способствует пролиферации.

Результаты данной работы вносят существенный вклад в развитие представлений об особенностях функционирования Wnt сигнального пути в меланоме человека. Полученные данные могут быть использованы при поиске и изучении молекулярных мишеней для диагностики и терапии злокачественных опухолей.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на Всероссийской научной школе для молодежи «Горизонты нанобиотехнологии» (Звенигород, Россия, 2009), 14-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых

«Биология - наука XXI века» (Пушино, 2010), XXIII Международной зимней молодежной научной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, Россия, 2011), VII Международном симпозиуме «Биологические основы терапии онкологических и гематологических заболеваний» (Москва, Россия, 2011) и на международных школах, конференциях и симпозиумах: FEBS/EARC Advanced Lecture Course "Molecular Mechanisms in Signal Transduction and Cancer" (Spetses, Greece, 2009), EMBO Molecular Medicine Workshop IRCC (Institute for Cancer Research and Treatment) "Invasive Growth: a Genetic Program for Stem Cell and Cancer" (Torino, Italy, 2009), Curie School "Cell Shape Changes: Cell Motility and Morphogenesis" (Paris, France, 2009), International symposium "Control of Gene Expression and Cancer" (Moscow, Russia, 2010), FEBS Advanced lecture course "Trends in genetics: genomic instability and pathways of response" (Yerevan, Armenia, 2011).

Личный вклад соискателя

Автором самостоятельно выполнен основной объем исследований, проведены обработка и анализ полученных экспериментальных данных, сформулированы основные положения диссертации, составляющие её новизну и практическую значимость, а также подготовлены материалы публикаций в научных журналах. Эксперименты по определению статуса активности канонического Wnt сигнального пути в клеточных линиях меланомы человека выполнены при участии Посвятенко А.В. (ИБГ РАН, Москва). Клеточные пулы, продуцирующие лиганды Wnt, получены при участии Литвинчук А.В. (МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва). Обсуждение и интерпретация полученных результатов проводились с участием Кибардина А.В. (ИБГ РАН, Москва).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ. Из них статей - 2, глава в монографии - 1, материалов конференций - 13.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 124 страницах, содержит 30 рисунков и 1 таблицу, включает следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и Методы, Результаты и Обсуждения, Заключение, Выводы, Список литературы (включает 322 цитируемых источника) и одно приложение.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Клетки линий меланомы человека экспрессируют гены базовых молекулярных компонентов, необходимых для миграции

Высоко агрессивный характер развития меланомы прежде всего связан в высокой метастатической активностью клеток этого новообразования. Клеточная подвижность, в свою очередь, на молекулярном уровне ассоциирована с присутствием набора компонентов, среди которых базовые маркеры эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП): транскрипционные факторы Slug, Twist1, Sip1 и Snail, и компонент промежуточных филаментов виментин.

Определение уровня экспрессии генов основных маркеров ЭМП методом полимеразной цепной реакции, сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в различных клеточных линиях меланомы человека позволило показать, что исследованные клеточные линии различаются между собой по набору детектированных транскриптов, при этом все они содержат мРНК как минимум четырех из пяти указанных генов (*Slug*, *Twist1*, *Sip1*, *Snail* или *Vimentin*) (рисунок 1).

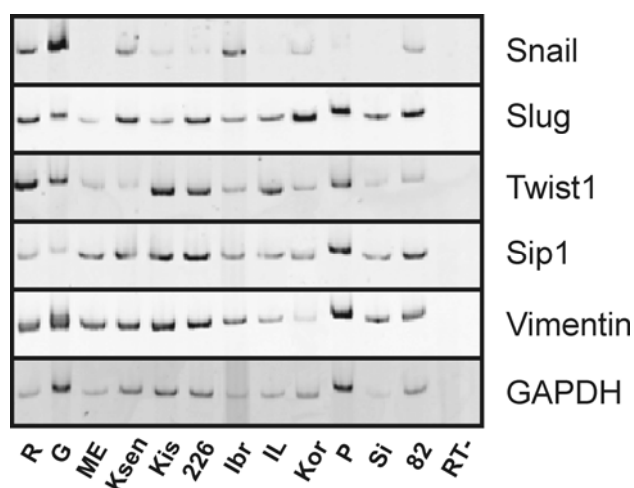


Рисунок 1. Анализ экспрессии генов маркеров эпителиально-мезенхимального перехода в клеточных линиях меланомы человека методом ОТ-ПЦР.

R, G, ME, Ksen, Kis, 226, Ibr, IL, Kor, P, Si, 82 - клеточные линии меланомы человека; (RT-) - отрицательный контроль ОТ-ПЦР; GAPDH - глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа.

Наличие экспрессии генов основных маркеров ЭМП говорит о том, что во всех исследованных клеточных линиях активирована программа эпителиально-мезенхимального перехода. Более того, присутствие базового набора транскрипционных факторов, обеспечивающих миграцию, также указывает на потенциальную способность клеток к активному движению.

2. Клеточные линии меланомы человека различаются по паттерну экспрессии генов молекулярных компонентов, ассоциированных с подвижностью

Реализация программы подвижности требует наличия определенных условий. Известно, что злокачественная трансформация меланоцитов сопровождается сменой типа молекул клеточной адгезии (E-кадгерин на N-кадгерин) (Hsu et al., 2000; Li et al., 2001) и подавлением экспрессии генов, регулирующих клеточную дифференцировку,

демонстрируя положительную корреляцию между накоплением β -катенина в ядрах клеток первичной опухоли/метастазов и продолжительностью жизни пациентов (Chien et al., 2009).

С целью выяснить значение β -катенинового сигнального каскада в формировании фенотипа меланомы человека клеточные линии меланомы были проанализированы на предмет внутриклеточной локализации основного медиатора канонического Wnt сигнального каскада β -катенина. Внутриклеточное распределение β -катенина изучалось при помощи иммуноцитохимического окрашивания исследуемых клеточных линий антителами к β -катенину. Обработка изображений проводилась в программе ImageJ, где измерялись интенсивности свечения ядер и клеток в целом. Границы ядер определялись с помощью окрашивания DAPI. Используемая методика позволила четко выделить границу между цитоплазматическим/мембранным и ядерным β -катенином (рисунок 3).

Полученные данные позволили условно разделить исследованные клеточные линии меланомы человека на две группы: с преимущественно ядерной (Mel11, Mel82, MelP, MelKor, Mel226, MelR) и с преимущественно цитоплазматической/мембранной (MelSi, MelME, MelG) локализацией β -катенина.

Правомочность подобного деления была подтверждена биохимическим методом. Для этого лизаты представителей каждой группы были подвергнуты фракционированию на конканавалин А (ConA)-сефарозе, после чего проанализированы методом вестернблот-анализа. В ходе подобного фракционирования происходит разделение внутриклеточного β -катенина на "свободный" (цитоплазматический и ядерный) и входящий в состав белкового комплекса адгезионных контактов (мембранно-связанный) (Aghib and McCrea, 1995).

Сравнение содержания β -катенина в обеих фракциях показало, что в MelG и MelME большая часть этого белка связана с мембраной, в то время, как в MelP и MelKor имеет место противоположное распределение. Эти данные полностью согласуются с результатами иммуноцитохимического анализа.

Сопоставление данных о внутриклеточном распределении β -катенина в клеточных линиях меланомы человека с проделанной ранее классификацией этих линий по степени прогрессии заболевания позволило выявить следующую тенденцию. Клеточные линии, соответствующие более ранним стадиям развития меланомы, демонстрируют преимущественно ядерную локализацию β -катенина. В то время как для линий, соответствующих более поздним стадиям (MelSi, MelME, MelG), характерна преимущественно мембранная/цитоплазматическая локализация этого белка. Исключение составляет только клеточная линия MelR, которая по наличию транскриптов маркеров клеточной подвижности и дифференцировки может быть соотнесена с терминальными стадиями развития опухоли, но при этом

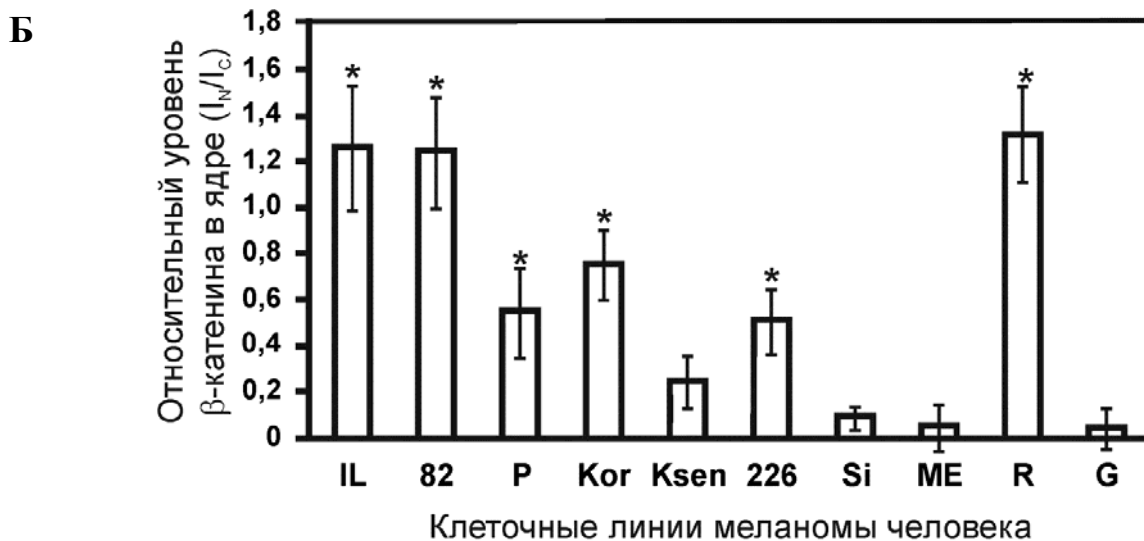
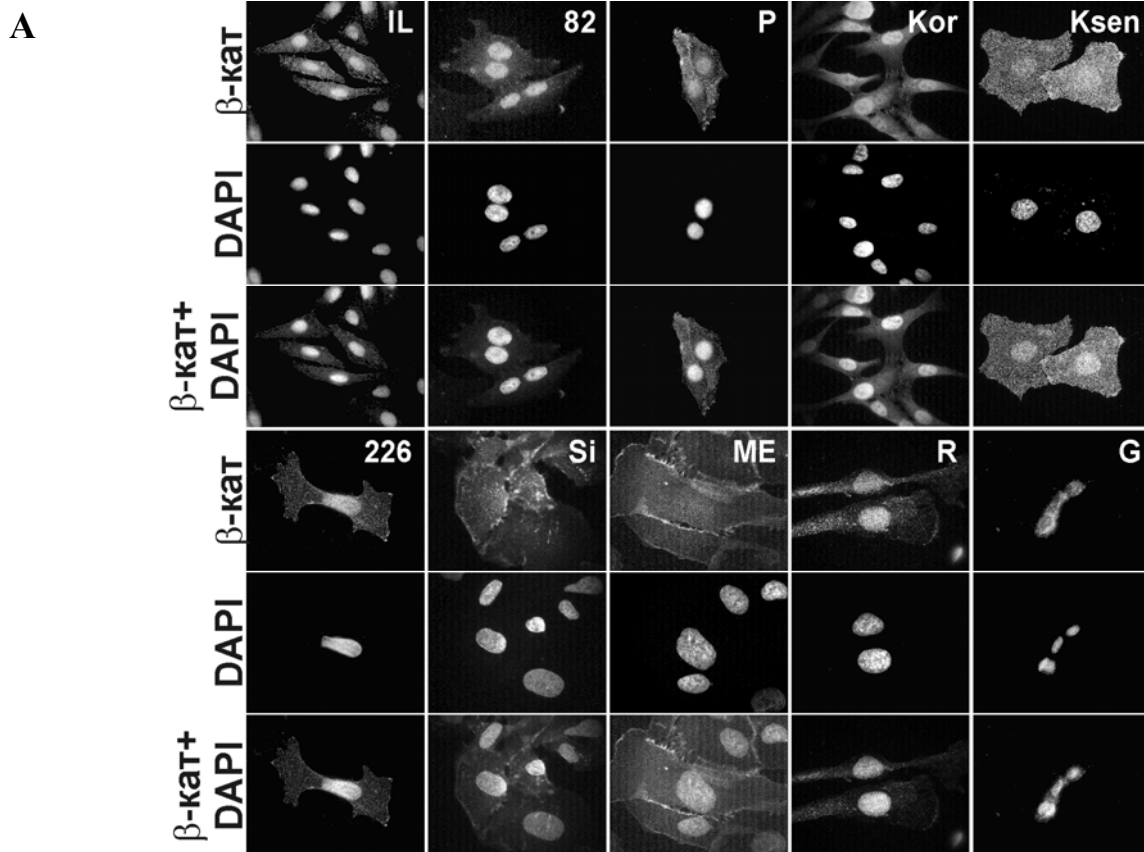


Рисунок 3. Локализация β -катенина в клеточных линиях меланомы человека.

(А) Иммуноцитохимическое окрашивание клеточных линий меланомы человека антителами к β -катенину. Ядра клеток окрашены DAPI. **(Б)** Содержание β -катенина в ядре по отношению к общему содержанию β -катенина внутри клетки. По оси ординат отложена величина I_N/I_C , отражающая уровень β -катенина в ядре по отношению к общему уровню внутри клетки. I_N - средняя яркость области ядра, а I_C - средняя яркость всей клетки. Звездочкой отмечены статистически достоверные различия в распределении β -катенина (ядро/клетка), измеренные по отношению к MelG ($p \leq 0,05$).

демонстрирует ярко-выраженную ядерную локализацию β -катенина. Отклонение MelR от прослеживаемой тенденции может быть объяснено наличием иных

внутриклеточных компонентов, чье влияние на фенотип данной линии оказывается более значимым, чем распределение β -катенина. Описанная тенденция потери внутриядерной локализации β -катенина при развитии меланомы ранее показана для солидных опухолей (Chien et al., 2009). Таким образом, в исследованных клеточных линиях внутриядерную локализацию β -катенина можно рассматривать как фактор, препятствующий развитию опухоли.

Согласно существующим представлениям ядерная локализация β -катенина должна сопровождаться активацией канонического Wnt сигнального пути (Weegaratra, 2005). В связи с этим, в исследованных клеточных линиях при помощи репортерной системы TOPFlash был проанализирован статус эндогенной активности β -катенинового сигнального каскада, а также определена способность этих линий активировать β -катениновый сигнальный каскад в ответ на лиганд Wnt3a.

Сравнительный анализ относительной активности TCF/LEF-зависимого промотора в отсутствие и при наличии лиганда Wnt3a выявил, что из восьми исследованных клеточных линий только в двух (MelP и MelG) активность TCF/LEF-зависимого промотора значительно усиливается в результате экспрессии *Wnt3a* (рисунок 4). В остальных клеточных линиях активации TCF/LEF-зависимого промотора при воздействии Wnt3a не происходит. При этом в двух из шести нечувствительных к Wnt3a линий (MelIL и MelKor) обнаружен высокий уровень активности TCF/LEF-зависимого промотора в отсутствие каких-либо дополнительных воздействий, что свидетельствует об эндогенной активности канонического Wnt сигнального пути. В оставшихся четырех линиях (MelKsen, Mel226, MelSi и Mel82) уровень активности репортерной конструкции был крайне низок по сравнению с другими клеточными линиями, причем в двух из них (Mel226 и Mel82) ранее была обнаружена ядерная локализация β -катенина. Отсутствие активности канонического Wnt сигнального пути при ярко выраженной преимущественно ядерной локализации основного эффектора β -катенина указывает на наличие дополнительных механизмов, препятствующих активации этого сигнального каскада.

Таким образом, для исследованных клеточных линий меланомы человека наблюдается тенденция потери выраженной внутриклеточной локализации β -катенина по мере прогрессии заболевания. В то же время подобной тенденции для статуса активности канонического Wnt сигнального пути в исследованных линиях не прослеживается. Для клеточных линий меланомы человека внутриядерная локализация β -катенина не является достаточным условием для активации канонического Wnt сигнального пути.

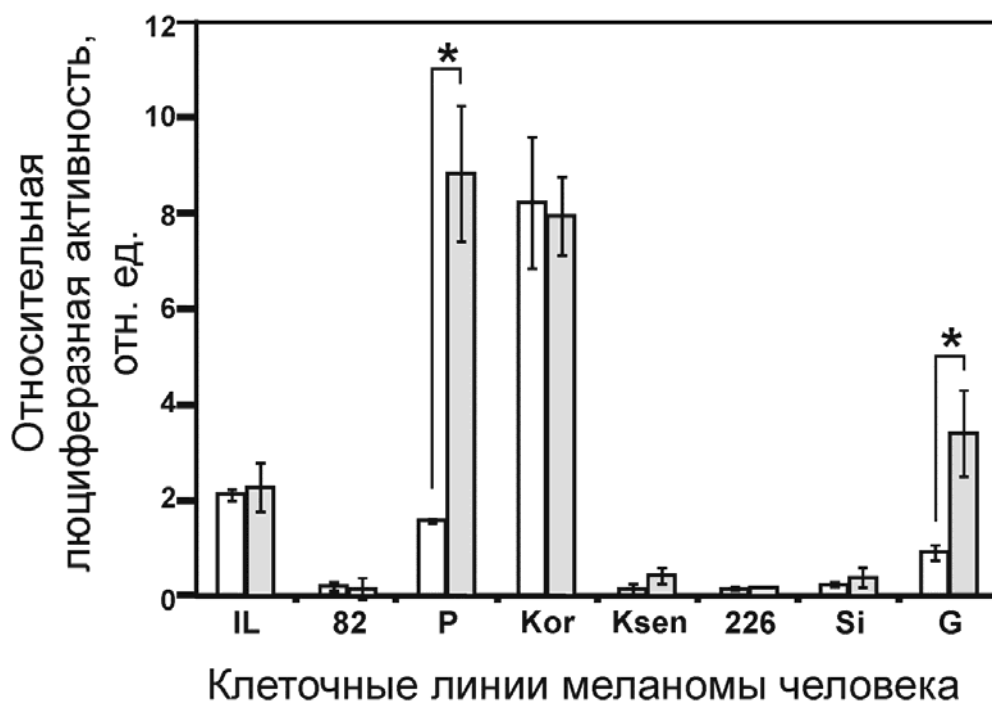


Рисунок 4. Активация TCF/LEF-зависимого промотора в клеточных линиях меланомы человека под воздействием лиганда Wnt3a.

Все клеточные линии были трансфицированы смесью плазмид TOPFlash+Ren+FRT (неокрашенные столбики) или смесью плазмид TOPFlash+Ren+FRT+Wnt3a (окрашенные столбики), где TOPFlash - плаزمид, содержащая репортерный ген люциферазы светлячка под контролем TCF/LEF-зависимого промотора, Ren - нормирующая плазмид pRL-CMV, FRT - плазмид pCDNATM5/FRT/TO, используемая в качестве пустого вектора, Wnt3a - плазмид pCMV-hWnt3a, содержащая ген *Wnt3a* человека. Звездочкой отмечены статистически достоверные различия между группами ($p \leq 0,05$).

4. Вариабельность паттерна экспрессии генов транскрипционных факторов TCF/LEF семейства в клеточных линиях меланомы человека

Одним из факторов, способных повлиять на активацию канонического Wnt сигнального каскада, может быть доступность ядерных белков-партнеров β -катенина, принадлежащих к семейству TCF/LEF, насчитывающему четыре транскрипционных фактора: LEF1, TCF1, TCF3, TCF4. При активации канонического Wnt сигнального каскада β -катенин транслоцируется в ядро и образует транскрипционно активный комплекс с TCF/LEF (Daniels and Weis, 2005).

Возможно неспособность ядерного β -катенина активировать канонический Wnt сигнальный путь в некоторых клеточных линиях меланомы человека является следствием отсутствия транскрипционных факторов семейства TCF/LEF. Для проверки данной гипотезы в имеющихся клеточных линиях меланомы человека была оценена экспрессия генов белков этого семейства методом ОТ-ПЦР (рисунок 5).

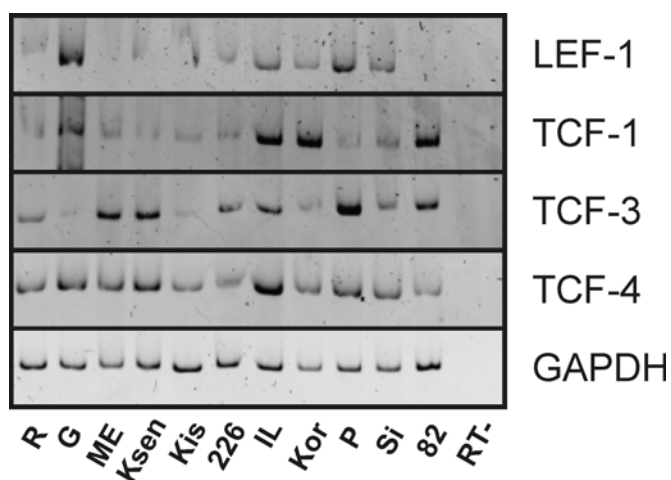


Рисунок 5. Анализ экспрессии генов транскрипционных факторов семейства TCF/LEF в клеточных линиях меланомы человека методом ОТ-ПЦР.

R, G, ME, Ksen, Kis, 226, Ibr, IL, Kor, P, Si, 82 - клеточные линии меланомы человека; (RT-) - отрицательный контроль ОТ-ПЦР; GAPDH - глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа.

Было установлено, что транскрипты факторов TCF/LEF присутствуют во всех исследованных клеточных линиях. При этом набор этих транскриптов от линии к линии существенно отличается. Единственным представителем семейства TCF/LEF, чей уровень транскрипта сравнительно одинаков для всех исследованных клеточных линий, является TCF-4. Экспрессия генов остальных членов семейства варьирует. Для большинства исследованных линий меланомы человека характерен низкий уровень мРНК LEF-1 и TCF-1. Транскрипт TCF-3, напротив, на достаточно высоком уровне детектируется в большинстве клеточных линий. Полученные данные позволили заключить, что неспособность некоторых клеточных линий меланомы человека, характеризующихся ярко-выраженной ядерной локализацией β -катенина, активировать канонический Wnt сигнальный путь не связана с отсутствием транскриптов факторов семейства TCF/LEF.

5. Транскрипционный фактор TCF-3 при меланоме может служить ингибитором канонического Wnt сигнального пути

Известно, что в некоторых системах TCF-3 может негативно влиять на активацию канонического Wnt сигнального пути (Yi et al., 2011). Учитывая эти данные и тот факт, что транскрипт TCF-3 был обнаружен во всех клеточных линиях с низким уровнем эндогенной активности канонического Wnt сигнального пути, была проверена потенциальная способность TCF-3 ингибировать активность TCF/LEF репортерной системы в клеточной линии меланомы человека. В качестве модельной системы была выбрана не экспрессирующая ген *TCF-3* клеточная линия MelG со средним уровнем эндогенной активности канонического Wnt сигнального пути, чувствительная к воздействию лиганда Wnt3a. Плазмида, кодирующая белок хTCF-3 *Xenopus laevis*, была любезно предоставлена профессором Сергеем Соколом (Mount Sinai School of Medicine, NY, USA). Клеточная линия MelG была протрансфицирована смесью репортерной плазмиды TOPFlash и нормирующей плазмиды pRL-CMV. Кроме того, часть трансфекционной смеси помимо TOPFlash и pRL-CMV содержала Wnt3a-кодирующую плазмиду, хTCF-3-кодирующую плазмиду или смесь этих двух

плазмид. В рамках данного эксперимента для активации канонического Wnt сигнального пути помимо Wnt3a-кодирующей плазмиды использовался также LiCl, который в отличие от Wnt лигандов воздействует на сигнальный путь не на уровне рецепторов, а на уровне β -катенин-деградирующего комплекса.

Трансфекция клеточной линии MelG *xTCF-3*-содержащей плазмидой сопровождалась существенным снижением транскрипции TCF/LEF-репортерного гена, стимулированной как лигандом Wnt3a, так и LiCl (рисунок 6).

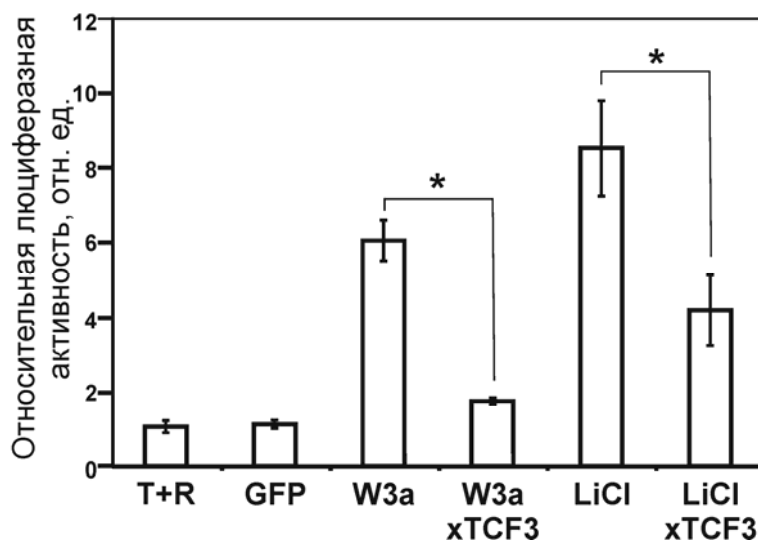


Рисунок 6. Экспрессия гена *xTCF-3* подавляет активацию транскрипции TCF/LEF - зависимого репортерного гена, стимулированную лигандом Wnt3a и LiCl, в клеточной линии меланомы человека MelG.

T - TOPFlash (плазида, содержащая репортерный ген люциферазы светлячка под контролем TCF/LEF-зависимого промотора); R - нормирующая плазида pRL-CMV; W3a - плазида pCMV-hWnt3a, кодирующая лиганд Wnt3a человека; xTCF3 - плазида, кодирующая транскрипционный фактор xTCF-3; LiCl - 20 mM хлорида лития. Звездочкой отмечены статистически достоверные различия в активности TCF/LEF - репортерного гена ($p \leq 0,05$).

Таким образом, в клеточной линии меланомы человека MelG TCF-3 может действовать как ингибитор канонического Wnt сигнального пути.

6. Для клеточных линий меланомы человека характерна экспрессия гена неканонического лиганда Wnt5a

Полагают, что неканонический Wnt сигнальный путь, активируемый Wnt5a, способствует метастазированию меланомы (Bittner et al., 2000; Weeraratna et al., 2002; Dissanayake et al., 2007). Функциональным антиподом неканонического Wnt5a в меланоме считают канонический Wnt3a. В то время как действие Wnt5a направлено на усиление метастатического потенциала клеток, для Wnt3a показано негативное влияние на способность клеточной линии меланомы мыши B16 к метастазированию (Chien et al., 2009; O'Connell and Weeraratna, 2009).

В имеющихся клеточных линиях меланомы человека методом ОТ-ПЦР было исследовано наличие транскриптов *Wnt5a* и *Wnt3a* (рисунок 7).

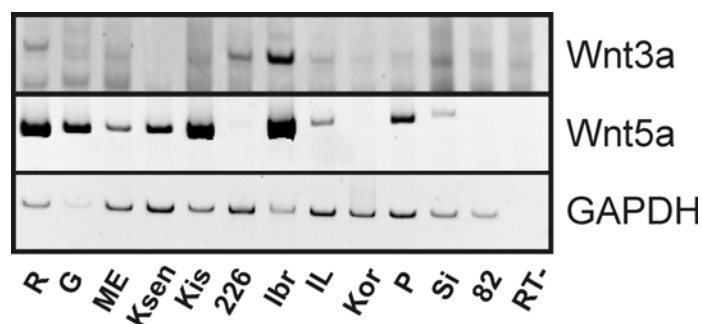


Рисунок 7. Анализ экспрессии генов канонического и неканонического лигандов Wnt в клеточных линиях меланомы человека методом ОТ-ПЦР.

R, G, ME, Ksen, Kis, 226, Ibr, IL, Kor, P, Si, 82 - клеточные линии меланомы человека; (RT-) - отрицательный контроль ОТ-ПЦР; GAPDH - глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа.

Транскрипт *Wnt5a* присутствует в подавляющем большинстве исследованных образцов (75%), ген *Wnt3a* экспрессируется лишь в нескольких клеточных линиях меланомы человека. По результатам, ранее полученным в нашей лаборатории, транскрипт другого неканонического лиганда *Wnt11* также часто встречается в исследованных клеточных линиях (75%).

При сравнении паттерна экспрессии гена *Wnt5a* в исследованных клеточных линиях меланомы человека с характером распределения этих линий относительно степени прогрессии опухоли, выяснилось, что транскрипт *Wnt5a* присутствует во всех выделенных группах. Данное наблюдение говорит о том, что лиганд *Wnt5a* важен для всех этапов прогрессии опухоли.

7. Неканонические и канонический Wnt лиганды вызывают усиление миграции клеточной линии меланомы человека MeIP

Для изучения влияния лигандов *Wnt5a*, *Wnt11* и *Wnt3a* на поведение клеток меланомы человека была выбрана модельная клеточная линия меланомы человека MeIP. Выбор клеточной линии определялся тем, что для исследования необходима модель, способная реагировать на разнонаправленные воздействия, поскольку *Wnt5a* и *Wnt3a* в меланоме считаются функциональными антагонистами (Weeraratna et al., 2002) (Chien et al., 2009). Клеточная линия меланомы человека MeIP, согласно ранее сделанной в данной работе классификации, может быть отнесена к промежуточным стадиям прогрессии метастазирующей меланомы. Ее фенотип может быть изменен в сторону как более поздней, так и более ранней стадии заболевания.

7.1. Создание клеточных пулов, стабильно продуцирующих рекомбинантные белки Wnt

На основании линии меланомы человека MelP были получены пулы клеток, стабильно продуцирующие Wnt лиганды: Wnt3a (пул MelP/Wnt3a), Wnt5a (пул MelP/Wnt5a) и Wnt11 (пул MelP/Wnt11), а также флюоресцентный зеленый белок GFP в качестве отрицательного контроля (пул MelP/GFP). Способность полученных пулов клеток продуцировать соответствующие рекомбинантные белки была подтверждена методом вестерн-блот анализа с использованием специфических антител к каждому рекомбинантному белку (рисунок 8).

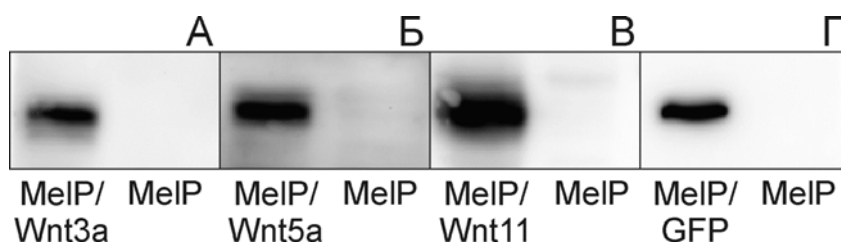


Рисунок 8. Анализ продукции рекомбинантных белков Wnt3a, Wnt5a, Wnt11 и GFP клетками пулов MelP/Wnt3a, MelP/Wnt5a, MelP/Wnt11 и MelP/GFP методом вестерн-блота. (А) Анализ лизата клеток пула MelP/Wnt3a и лизата родительской линии MelP с использованием антител против Wnt3a. (Б) Анализ лизата клеток пула MelP/Wnt5a и лизата родительской линии MelP с использованием антител против Wnt5a/b. (В) Анализ лизата клеток пула MelP/Wnt11 и лизата родительской линии MelP с использованием антител против Wnt11. (Г) Анализ лизата клеток пула MelP/GFP и лизата родительской линии MelP с использованием антител против GFP.

7.2. Оценка скорости миграции клеток линии MelP и клеток пулов, стабильно продуцирующих Wnt лиганды

Для оценки подвижности клеток как родительской клеточной линии меланомы человека MelP, так и полученных на ее основе клеток пулов MelP/Wnt3a, MelP/Wnt5a, MelP/Wnt11 и MelP/GFP был использован тест "миграция в дефект" (Scratch assay).

Результаты анализа данных, полученных в ходе теста, показали, что скорость восстановления "дефекта" клетками, экспрессирующими гены любого из лигандов Wnt (Wnt3a, Wnt5a или Wnt11), в несколько раз превышает таковую родительской линии MelP (рисунок 9). Wnt5a ускоряет процесс восстановления в $2,3 \pm 0,6$ раза, Wnt3a в $3 \pm 0,5$ раза, а Wnt11 в $3,9 \pm 1$ раза. В то же время клетки MelP и MelP/GFP затягивают "дефект" с одинаковой скоростью, что говорит о том, что продукция GFP не влияет на подвижность клеток.

Таким образом, основываясь на проведенном анализе, можно заключить, что как канонический Wnt3a, так и неканонические Wnt5a и Wnt11 оказывают стимулирующее воздействие на способность клеток линии меланомы человека MelP сокращать площадь искусственно созданного "дефекта".

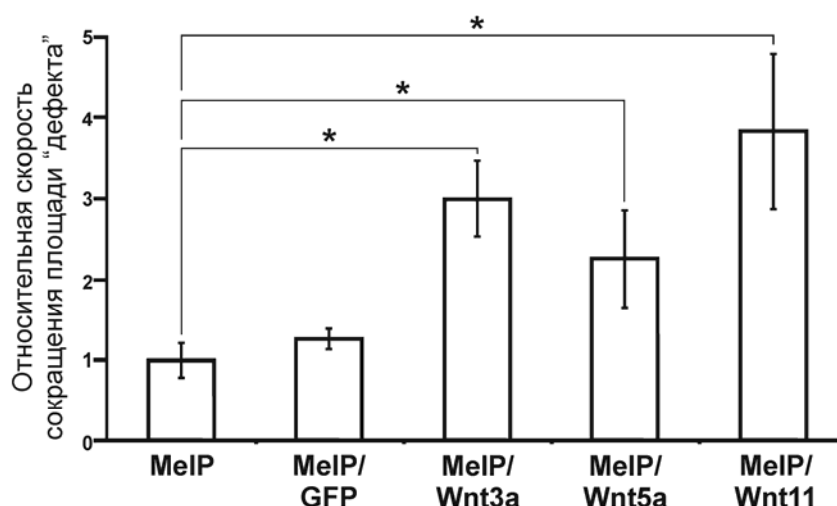


Рисунок 9. Относительная скорость восстановления "дефекта" клетками родительской линии MelP и клетками пулов MelP/Wnt3a, MelP/Wnt5a, MelP/Wnt11 и MelP/GFP, измеренная при помощи теста миграция в "дефект".

Звездочкой отмечены статистически достоверные различия между группами ($p \leq 0,05$).

8. Неканонический лиганд Wnt11 стимулирует пролиферацию клеток MelP

Изменение скорости сокращения площади "дефекта" в ответ на стимулирующее воздействие может быть связано не столько с усилением подвижности, но и с активацией пролиферации клеток (здесь и далее в тексте под пролиферацией понимается увеличение числа жизнеспособных клеток в культуре). Для выявления вклада этого фактора для клеток родительской клеточной линии MelP и клеток всех стабильных пулов MelP/GFP, MelP/Wnt3a, MelP/Wnt5a и MelP/Wnt11 была измерена эффективность пролиферации.

Эффективность клеточной пролиферации оценивалась при помощи теста CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS). При этом считается, что оптическая плотность раствора, полученного в результате реакции, в лунках культурального планшета, прямо пропорциональна числу живых клеток в культуре. В качестве отрицательного контроля использовалась среда для культивирования.

Полученные данные позволили прийти к следующему заключению. Как и в случае с миграцией, продукция GFP не влияет на скорость пролиферации родительской линии MelP (рисунок 10). Графики, описывающие пролиферацию MelP и MelP/Wnt5a, также совпадают, что указывает на близкие скорости роста этих культур. Учитывая, что в эксперименте на миграцию клетки пула MelP/Wnt5a закрывали "дефект" быстрее, чем клетки родительской линии MelP, можно заключить, что разница в скоростях закрывания "дефекта" между этими двумя линиями преимущественно является следствием различий в подвижности клеток, а не скорости их деления. В случае с Wnt11 ситуация противоположна. Клетки пула MelP/Wnt11 пролиферируют быстрее, чем клетки родительской линии MelP. Отсюда следует, что эффект ускоренного затягивания "дефекта" клетками MelP/Wnt11

обусловлен во многом именно высокой скоростью их пролиферации. Скорость роста культуры MelP/Wnt3a, напротив, ниже, чем та, что характерна для родительской линии MelP. При этом скорость затягивания "дефекта" этими клетками примерно в 3 раза выше, чем клетками линии MelP. Все это говорит о том, что экспрессия гена *Wnt3a* усиливает именно миграцию клеточной линии меланомы человека, в то время как скорость роста культуры, напротив, падает.

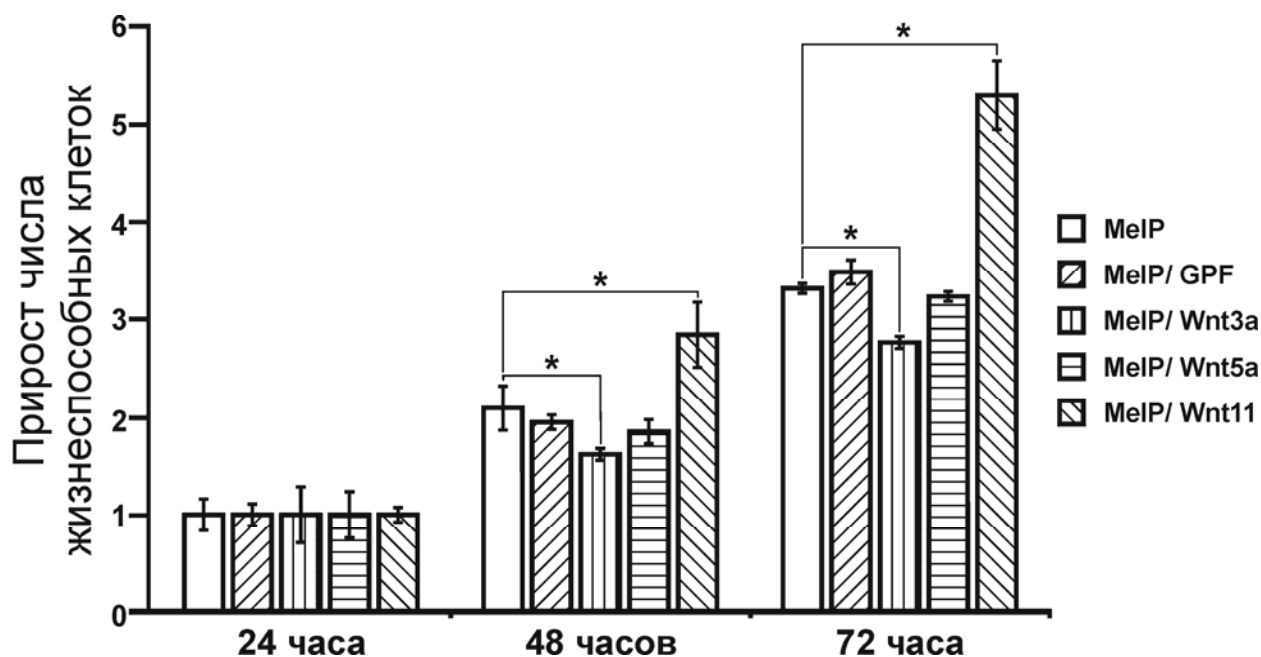


Рисунок 10. Изменение числа жизнеспособных клеток в культуре для клеточной линии MelP и пулов MelP/Wnt3a, MelP/Wnt5a, MelP/Wnt11 и MelP/GFP.

Звездочкой отмечены статистически достоверные отличия между группами ($p \leq 0,05$).

Таким образом, несмотря на то, что все исследованные Wnt лиганды сходно влияют на скорость затягивания искусственного "дефекта" опухолевыми клетками MelP, природа их стимулирующего воздействия различается. Wnt5a активирует подвижность клеток, Wnt11 усиливает преимущественно скорость роста культуры, а Wnt3a стимулирует подвижность, но при этом подавляет пролиферацию клеток.

9. Усиление миграции клеточной линии меланомы человека MelP под действием Wnt3a не связано с активацией канонического Wnt сигнального пути

В клеточной линии MelP лиганд Wnt3a активирует канонический Wnt сигнальный путь. Учитывая этот факт, было необходимо выяснить, является ли усиление миграции клеток MelP под действием Wnt3a следствием активации данного сигнального каскада. С этой целью в родительской клеточной линии MelP канонический Wnt сигнальный путь активировали двумя способами: специфически посредством рекомбинантного белка Wnt3a и неспецифически при помощи LiCl. Лиганд Wnt3a запускает передачу сигнала на уровне рецептора, а действие LiCl

непосредственно направлено на белковый комплекс, участвующий в деградации основного медиатора канонического Wnt сигнального пути β -катенина (рисунок 11).

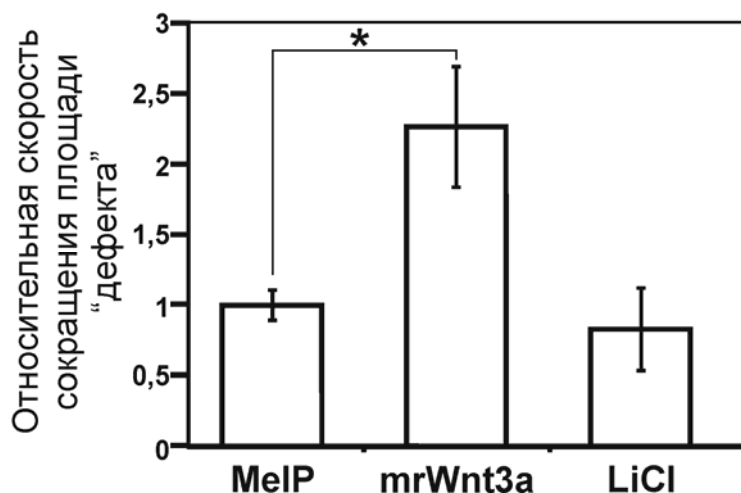


Рисунок 11. Относительная скорость восстановления "дефекта" клетками родительской линии меланомы человека MelP в присутствии рекомбинантного белка mrWnt3a или LiCl.

mrWnt3a (mouse recombinant Wnt3a) - 50 ng/ml рекомбинантного белка Wnt3a мыши; LiCl - 20 mM хлорида лития. Звездочкой отмечены статистически достоверные различия между группами ($p \leq 0,05$).

Анализ полученных результатов показал, что добавление рекомбинантного белка Wnt3a усиливает, в то время как добавление LiCl не влияет на скорость закрытия "дефекта" клетками MelP. Поскольку LiCl считается неспецифическим активатором β -катенинового сигнального пути, его неспособность стимулировать миграцию клеток MelP говорит о независимом от активации канонического Wnt сигнального каскада характере действия Wnt3a на клеточную подвижность.

10. В клеточной линии MelP лиганды Wnt3a, Wnt5a и Wnt11 активируют сигнальный путь, связанный с увеличением уровня внутриклеточного кальция

Существует целая группа данных, говорящих о том, что эффект от связывания Wnt лигандов сильно зависит от комбинации доступных рецепторов и корецепторов на поверхности клетки (Smit et al., 2004; Tao et al., 2005; Wallingford and Habas, 2005; Mikels and Nusse, 2006). Учитывая, что в изменении клеточной подвижности преимущественно задействованы неканонические Wnt сигнальные пути, была проверена способность канонического Wnt3a и неканонических Wnt5a и Wnt11 активировать Wnt/ Ca^{2+} -зависимый сигнальный каскад в исследуемой клеточной системе MelP.

С этой целью была создана генно-инженерная конструкция, содержащая репортерный ген люциферазы светлячка (*FFly*) под контролем минимального промотора SV40, которому предшествуют 8 сайтов связывания для транскрипционного фактора NFAT (Nuclear factor of activated T-cells). Активность

транскрипционного фактора NFAT подвержена регуляции под действием Ca^{2+} -зависимого сигнального пути. Принцип действия репортерной системы NFAT напоминает тот, что характерен для репортерной системы TOPFlash. Связывание Wnt лиганда, индуцирующее повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} , приводит к транслокации NFAT в ядро и к активации экспрессии NFAT-зависимого репортерного гена (Dejmek et al., 2006).

Проверку функциональной активности созданной репортерной системы NFAT осуществляли с использованием неспецифического активатора Wnt/ Ca^{2+} -зависимого сигнального пути ионофора A23187. Для этого клеточную линию MelP, трансфицируемую смесью NFAT-репортерной и нормирующей плазмид, обработали A23187 (рисунок 12).

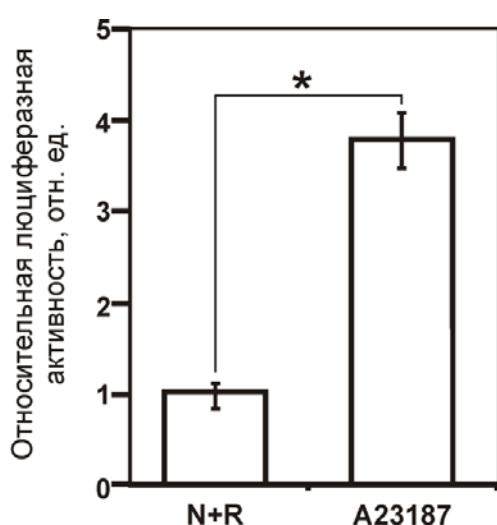


Рисунок 12. Активация NFAT - зависимой репортерной системы в присутствии ионофора A23187.

**N - NFAT-репортерная плазмида;
R - нормирующая плазмида pRL-CMV;
A23187 - Ca^{2+} - ионофор. Звездочкой отмечены статистически достоверные различия между группами ($p \leq 0,05$).**

Добавление ионофора к культуре клеток MelP, транзитивно трансфицированных смесью NFAT-репортерной и нормирующей плазмид, приводило к увеличению уровня экспрессии NFAT-зависимого репортерного гена почти в 4 раза.

Полученная репортерная система позволила оценить вклад различных лигандов Wnt в изменение активности Wnt/ Ca^{2+} -зависимого сигнального пути в клеточной линии меланомы человека MelP. С этой целью данная клеточная линия была одновременно трансфицирована смесью NFAT-репортерной и нормирующей плазмид, а также плазмидой, кодирующей лиганд Wnt (Wnt3a, Wnt5a или Wnt11), либо пустым вектором в качестве отрицательного контроля. Результаты анализа относительной активности люциферазы *FFly* показали, что в исследуемой системе Wnt лиганды Wnt11, Wnt5a и Wnt3a могут стимулировать Wnt/ Ca^{2+} -сигнальный путь (рисунок 13).

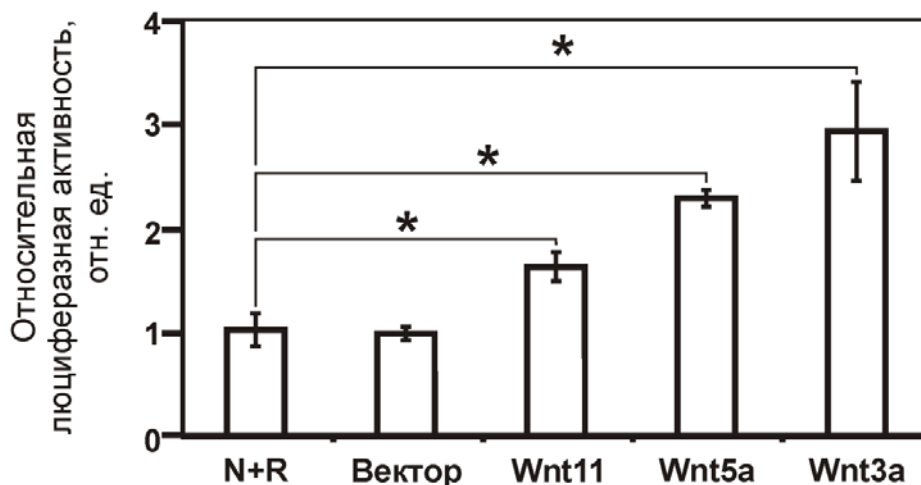


Рисунок 13. Активация NFAT - зависимой репортерной системы под действием лигандов Wnt5a, Wnt3a, Wnt11.

N - NFAT-репортерная плаزمида; **R** - нормирующая плазмида pRL-CMV; **Вектор** - пустой вектор; **Wnt5a** - плазмида, содержащая ген *Wnt5a* человека; **Wnt3a** - плазмида, содержащая ген *Wnt3a* человека; **Wnt11** - плазмида, содержащая ген *Wnt11* человека. Звездочкой отмечены статистически достоверные различия между группами ($p \leq 0,05$).

Таким образом, в клеточной линии меланомы человека MelP как неканонические лиганды Wnt5a и Wnt11, так и классический канонический лиганд Wnt3a способны активировать сигнальный путь, связанный с изменением уровня внутриклеточного Ca^{2+} . Более того, эффект от Wnt3a-опосредованной стимуляции Wnt/ Ca^{2+} -сигнального пути оказался сравнимым с эффектом от Wnt5a, который рассматривается как основной лиганд сигнального каскада, связанного с изменением уровня цитоплазматического Ca^{2+} .

С целью подтвердить, что обнаруженная Wnt3a-опосредованная активация Wnt/ Ca^{2+} -сигнального пути не связана с генными манипуляциями, которым подвергаются клетки, предыдущий эксперимент был модифицирован. Трансфекция *Wnt3a*-содержащей плазмидой была заменена добавлением рекомбинантного белка mrWnt3a. Обработка клеточной линии MelP рекомбинантным mrWnt3a приводила к возрастанию экспрессии NFAT-зависимого репортерного гена (рисунок 14, А).

Учитывая тот факт, что в исследуемой клеточной линии лиганд Wnt3a успешно активирует канонический Wnt сигнальный путь, необходимо было исключить вероятность β -катенин-зависимого влияния Wnt3a на Wnt/ Ca^{2+} -сигнальный каскад. Обработка клеток MelP неспецифическим ингибитором GSK-3 β LiCl вызывала частичное ингибирование активности NFAT-репортерной системы (рисунок 14, Б), указывая на независимый от стабилизации β -катенина характер активации Wnt3a-стимулированного Wnt/ Ca^{2+} -зависимого пути.

Таким образом, Wnt/ Ca^{2+} -стимулирующий эффект Wnt3a является специфичным, не связан с действием процедуры трансфекции белок-кодирующей

плазмидой и не зависит от стабилизации основного медиатора канонического Wnt сигнального пути β -катенина.

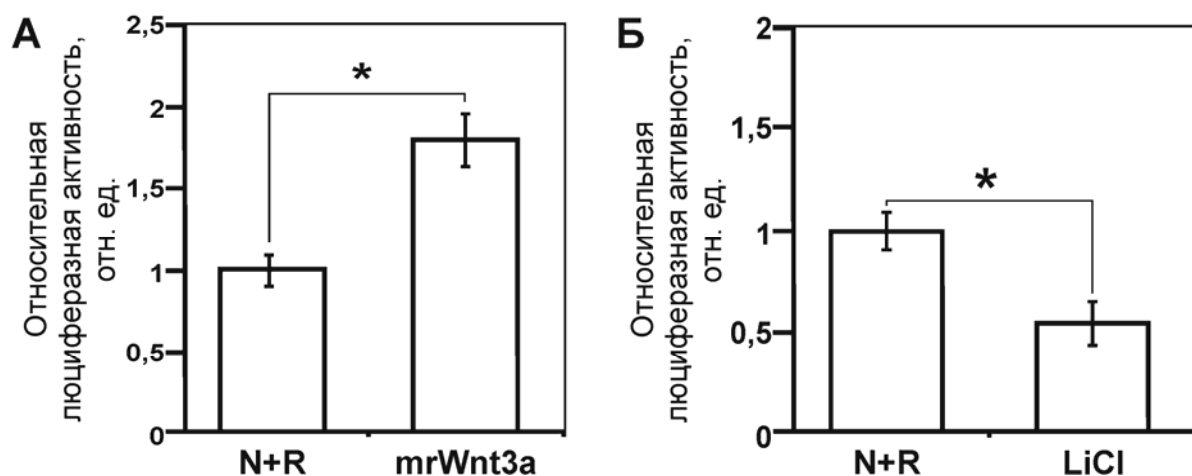


Рисунок 14. Активация NFAT - зависимой репортерной системы в клеточной линии MelP под действием рекомбинантного белка mrWnt3a (A) и LiCl (B).

N - NFAT-репортерная плаزمида; **R** - нормирующая плазмида pRL-CMV; **mrWnt3a** (mouse recombinant Wnt3a) - культивирование клеток в присутствии 50 нг/мл рекомбинантного белка Wnt3a мыши, **LiCl** - культивирование клеток в присутствии 20 мМ хлорида лития.

Звездочкой отмечены статистически достоверные различия между группами ($p \leq 0,05$).

Исходя из изложенных выше данных, можно заключить, что клетки всех исследованных в работе линий меланомы человека потенциально способны к активной миграции, поскольку содержат набор базовых молекулярных компонентов, необходимых для передвижения. Тем не менее, одного наличия базовых компонентов, обеспечивающих миграцию клеток, не достаточно для формирования высоко подвижного фенотипа опухоли. Успешная реализация программы подвижности зависит от ряда факторов, в числе которых активность внутриклеточных сигнальных каскадов, влияющих на продукцию разнообразных молекулярных компонентов, способствующих миграции.

В данной работе было впервые показано, что выраженная ядерная локализация β -катенина не является достаточным условием для активации канонического Wnt сигнального пути в клеточных линиях меланомы человека. Подобное наблюдение дает возможность по-новому взглянуть на роль канонического Wnt сигнального пути в формировании фенотипа опухоли. Для меланомы характерна тенденция к потере внутриядерной локализации β -катенина по мере прогрессии опухоли. При этом аналогичной тенденции по изменению статуса активности канонического Wnt сигнального пути при прогрессии меланомы в рамках данного исследования выявлено не было. Таким образом, несмотря на то, что, по крайней мере, в некоторых экспериментальных системах внутриядерную локализацию β -катенина можно

рассматривать как фактор, препятствующий развитию опухоли, зависимость между локализацией β -катенина и степенью прогрессии меланомы определяется не столько активностью канонического Wnt сигнального пути, сколько наличием альтернативных молекулярных факторов, также способных влиять на внутриклеточную локализацию β -катенина.

В рамках данного исследования было изучено не только значение конкретного сигнального пути для прогрессии меланомы, но и характер влияния лигандов семейства Wnt на формирование фенотипа опухоли. Wnt3a способен активировать миграцию, а Wnt11 еще и пролиферацию опухолевых клеток MelP. Более того, эффект на миграцию от канонического Wnt3a имитировал действие, оказываемое неканоническим Wnt5a, что опровергает предположение о функциональном антагонизме данных лигандов при меланоме. Wnt3a-опосредованная миграция не зависит от активации канонического Wnt сигнального пути, поскольку добавление LiCl не влияет на подвижность клеток. Помимо миграции Wnt3a также оказывает влияние на пролиферацию опухолевых клеток, снижая скорость их роста. Несмотря на кажущееся противоречие эффектов, оказываемых Wnt3a, как активизация подвижности, так и ингибирование пролиферации способны положительно повлиять на метастазирование опухоли.

В исследованной системе MelP все Wnt лиганды, вне зависимости от того, считаются они каноническими или неканоническим, активируют сигнальный каскад, связанный с увеличением уровня цитоплазматического Ca^{2+} . При этом, Wnt3a также активирует канонический β -катениновый сигнальный путь.

ВЫВОДЫ

1. Для всех исследованных клеточных линий меланомы человека характерна экспрессия генов маркеров эпителиально-мезенхимального перехода: Slug, Twist1, Sip1, виментина, что свидетельствует об активированном статусе программы эпителиально-мезенхимального перехода в изученных линиях.
2. Впервые показано, что накопление β -катенина в ядрах клеток линий меланомы человека не может служить достаточным условием для активации канонического Wnt сигнального пути.
3. Как канонический Wnt3a, так и не канонический Wnt5a лиганды усиливают подвижность клеток линии меланомы человека MelP.
4. Неканонический лиганд Wnt11 усиливает пролиферацию культуры клеточной линии меланомы человека MelP, в то время как канонический лиганд Wnt3a оказывает противоположное действие.
5. В клеточной линии меланомы человека MelP канонический лиганд Wnt3a способен активировать сигнальный путь, связанный с увеличением уровня внутриклеточного кальция.

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах:

1. К.В. Куликова, А.В. Посвятенко, Н.В. Гнучев, Г.П. Георгиев, А.В. Кибардин, С.С. Ларин (2011). Внутрядерная локализация β -катенина не может считаться достаточным условием для активности канонического сигнального пути Wnt в клеточных линиях меланомы человека. Молекулярная биология 45(5): 884–891.
2. А.В. Посвятенко, К.В. Куликова, Н.В. Гнучев, Г.П. Георгиев, А.В. Кибардин, С.С. Ларин (2012). Функциональные свойства новой изоформы лиганда Wnt11, экспрессирующейся в клетках линии карциномы кишечника человека HT29. Молекулярная биология 46(1): 129–138.

Главы в монографиях:

1. Ksenia Kulikova, Alexey Kibardin, Nikolay Gnuchev, Georgii Georgiev and Sergey Larin (2011). Research on Melanoma - A Glimpse into Current Directions and Future Trends. Chapter Dual Function of Wnts in Human Cutaneous Melanoma (pp 243-268). InTech. ISBN 978-953-307-293-7.

Тезисы конференций:

1. Kseniya V. Kulikova, Alexey V. Kibardin, Aleksandra V. Posvyatenko, Nikolay V. Gnuchev, Georgii P. Georgiev and Sergey S. Larin. Noncanonical Wnt cascades interplay in melanoma aggressive phenotype formation. The FEBS/EARC Advanced Lecture Course " Molecular Mechanisms in Signal Transduction and Cancer" Co-sponsored by CGC, the Island of Spetses, Greece. August 16 - 25, **2009**.
2. A.V. Posvyatenko, A.V. Kibardin, K.V. Kulikova, N.V. Gnuchev, G.P. Georgiev, and Sergey S. Larin. Mechanisms of Wnt11 signaling pathway regulation in human melanoma cell lines. Invasive Growth: a Genetic Program for Stem Cell and Cancer. EMBO Molecular Medicine Workshop IRCC, Institute for Cancer Research and Treatment, Torino, Italy. September 10-12, **2009**, p. 52
3. Куликова К.В., Кибардин А.В., Посвятенко А.В., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Ларин С.С. Влияние активации неканонических Wnt сигнальных путей на формирование агрессивного опухолевого фенотипа линий меланомы человека. Всероссийская научная школа для молодежи «Горизонты нанобиотехнологии», Звенигород, Россия. 12-16 октября **2009**, стр. 52.
4. Kseniya V. Kulikova, Alexey V. Kibardin, Aleksandra V. Posvyatenko, Nikolay V. Gnuchev, Georgii P. Georgiev and Sergey S. Larin. Wnt signaling and melanoma aggressive phenotype formation. Curie School Cell Shape Changes: Cell Motility and Morphogenesis, Paris, France. October 19-23, **2009**.
5. Куликова К.В., Кибардин А.В., Посвятенко А.В., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Ларин С.С. Гетерогенность паттерна экспрессии молекулярных маркеров в клеточных линиях меланомы человека. 14 Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых "Биология - наука XXI века", Пушино, Россия. 19-23 апреля **2010**, стр. 149.

6. Aleksandra V. Posvyatenko, Alexey V. Kibardin, Ksenia V. Kulikova, Nikolay V. Gnuchev, Georgii P. Georgiev and Sergei S. Larin. Wnt11 splice-variant expression in HT29 colon carcinoma cell line. International symposium "Control of Gene Expression and Cancer", Moscow, Russia. June 21-25, **2010**, p. 75.
7. Ksenia V. Kulikova, Alexey V. Kibardin, Aleksandra V. Posvyatenko, Nikolay V. Gnuchev, Georgii P. Georgiev and Sergey S. Larin. Expression pattern of EMT associated markers in different human melanoma cell lines. International symposium "Control of Gene Expression and Cancer", Moscow, Russia. June 21-25, **2010**, p. 76.
8. Alexey V. Kibardin, Aleksandra V. Posvyatenko, Kseniya V. Kulikova, Sergei Nabirochkin, Nikolay V. Gnuchev, Georgii P. Georgiev and Sergey S. Larin. Effect of Wnt11 ligand alternative splicing on Wnt signaling regulation. International symposium "Control of Gene Expression and Cancer", Moscow, Russia. June 21-25, **2010**, p. 44.
9. Куликова К.В., Посвятенко А.В., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Кибардин А.В., Ларин С.С. Анализ взаимосвязи внутриклеточной локализации бета-катенина и активности канонического сигнального пути Wnt в клеточных линиях меланомы человека. XXIII Международная зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, Россия. 7-10 февраля **2011**, стр. 10.
10. Ksenia V. Kulikova, Alexey V. Kibardin, Aleksandra V. Posvyatenko, Nikolay V. Gnuchev, Georgii P. Georgiev and Sergey S. Larin. Motility related gene expression pattern and its correlation with noncanonical Wnt ligand expression in human melanoma cell lines. FEBS Advanced lecture course "Trends in genetics: genomic instability and pathways of response". Yerevan, Armenia. February 20-26, **2011**, p. 82.
11. К.В. Куликова, А.В. Кибардин, А.В. Посвятенко, Н.В. Гнучев, Г.П. Георгиев, С.С. Ларин. Выявление роли лигандов WNT в формировании агрессивного опухолевого фенотипа линий меланомы человека. VII симпозиум «Биологические основы терапии онкологических и гематологических заболеваний», Москва, Россия. 1-4 июня, **2011**. Онкогематология №2 (2011), стр. 44-45.
12. А.В. Посвятенко, К.В. Куликова, А.В. Кибардин, Н.В. Гнучев, Г.П. Георгиев, С.С. Ларин. Экспрессия сплайс-вариантов Wnt11 в клетках линии колоректального рака (HT29). VII симпозиум «Биологические основы терапии онкологических и гематологических заболеваний», Москва, Россия. 1-4 июня, **2011**. Онкогематология №2 (2011), стр. 49.
А.В. Кибардин, А.В. Посвятенко, К.В. Куликова, Н.В. Гнучев, Г.П. Георгиев, С.С. Ларин. Изоформы лиганда Wnt11 и их функциональные свойства. VII симпозиум «Биологические основы терапии онкологических и гематологических заболеваний», Москва, Россия. 1-4 июня, **2011**. Онкогематология №2 (2011), стр. 40.