

Посвятенко
Александра Викторовна

ЭКСПРЕССИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА
НОВЫХ ИЗОФОРМ ЛИГАНДА WNT11

Специальность – 03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва
2012 год

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:**

Яровая Ольга Владимировна, доктор биологических наук, профессор, ИБГ РАН, главный научный сотрудник

Севостьянова Ирина Александровна, кандидат биологических наук, ФББ МГУ, доцент

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение

науки Институт молекулярной биологии

им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук

Защита состоится «27» апреля 2012 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 002.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте 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 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фарм. наук

Грабовская Любовь Сергеевна

Актуальность проблемы

Генетические нарушения, влияющие на активность сигнальных путей, контролирующих эмбриональное развитие, рост, дифференцировку клеток и устойчивость к апоптозу, могут приводить к возникновению и развитию опухоли (Logan C.Y., Nuss R., 2004). При этом нестабильность генома опухолевых клеток сильно затрудняет создание эффективных лекарственных препаратов, так как трансформированные клетки, в силу высокой лабильности генома быстро приобретают устойчивость к терапевтическому воздействию. Понимание молекулярных механизмов, сопровождающих злокачественную трансформацию, позволит в дальнейшем разработать инструменты, препятствующие этому процессу.

Сигнальные пути Wnt играют ключевую роль как в эмбриональном развитии, так и в поддержании гомеостаза взрослого организма (Cadigan K.M. and Nuss R., 1997). Аберрантная активация сигнальных путей, активируемых семейством белков Wnt, вызывает или усугубляет злокачественную трансформацию клеток (Polakis P. 2000, Lustig V. and Behrens J., 2003). Эффекты от активации сигнальных путей Wnt в нормальной ткани определяют последствия их аберрантной активации в опухолевых тканях. Например, описана активация канонического сигнального пути Wnt в процессе позиционирования и дифференцировки меланоцитов (Dunn K.J. et al., 2000). При этом пациенты с диагнозом меланомы имеют лучший прогноз в случае, если в клетках опухоли детектируется активация канонического сигнального пути Wnt (Chien A.J. et al., 2009). И наоборот, при колоректальном раке в 80% случаев установлена аберрантная активация канонического сигнального пути Wnt (Rubinfeld B. et al., 1997). Вероятно, в данном случае канонический сигнальный путь Wnt является одним из компонентов процесса злокачественного перерождения клеток, так как в норме его активация регулирует пролиферацию и дифференцировку клеток эпителия крипт-ресничек (Ouko L. et al., 2004). Лиганд неканонического сигнального пути Wnt (путь планарной клеточной полярности) Wnt11 регулирует подвижность клеток в процессе формирования нервного гребня, а в эпителии кишечника Wnt11 экспрессируется как в эмбриональном развитии, так и во взрослом организме, регулируя пролиферацию, дифференцировку и миграцию клеток (Matthews N.K. et al., 2008, Lickert H. et al., 2001). Роль пути планарной клеточной полярности в формировании и прогрессии меланомы и колоректального рака не исследована, хотя показано, что в клетках колоректального рака экспрессия лиганда Wnt11 выше, чем в нормальных клетках (Nishioka M. et al., 2011). И в клетках-предшественниках меланоцитов, и в эпителии кишечника путь планарной клеточной полярности, активируемый лигандом Wnt11, регулирует подвижность клеток. Миграция клеток является неотъемлемой частью процессов инвазии и метастазирования. Метастазирование - наиболее опасное проявление опухолевой прогрессии, являющееся основной причиной смерти онкологических больных.

Данная работа посвящена исследованию экспрессии лиганда пути планарной клеточной полярности Wnt11 человека (hWnt11) в опухолевых клетках. Для различных сигнальных каскадов описаны механизмы, регулирующие активность лигандов за счет

альтернативного сплайсинга (Park J.E. et al., 1993, Лукьянов Е.В. и др., 2002). Однако в случае сигнального пути Wnt, информация о существовании изоформ лигандов Wnt ограничивается несколькими фактами (Fear M.W. et al., 2000, Struewing I.T. et al., 2006). Экспериментальные данные о существовании изоформ лиганда hWnt11 отсутствуют. Потенциально, разные изоформы одного белка могут обладать различной функциональной активностью и, как следствие, по-разному влиять на опухолевую прогрессию.

Цели и задачи:

В связи с вышеизложенным, целью работы является изучение экспрессии лиганда hWnt11 в клеточных линиях опухолей различного происхождения и его роли в регуляции сигнальных путей Wnt.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие экспериментальные задачи:

- 1) исследовать экспрессию лиганда hWnt11 в опухолевых клеточных линиях;
- 2) провести поиск изоформ лиганда hWnt11;
- 3) исследовать функциональные свойства изоформ лиганда hWnt11.

Научная новизна работы.

Активация пути планарной клеточной полярности регулирует подвижность клеток - свойство, необходимое для прогрессии опухоли. Несмотря на это, экспрессия лиганда hWnt11, активирующего путь планарной клеточной полярности, не была ранее исследована в меланомах. В данной работе впервые методом ОТ-ПЦР анализа исследована экспрессия лиганда hWnt11 в клеточных линиях меланомы человека. Показано, что экспрессия hWnt11 характерна для большинства исследованных клеточных линий меланомы человека (75%). Установлено, что в результате ОТ-ПЦР детектируется несколько различающихся по размеру ПЦР-фрагментов, нуклеотидная последовательность которых соответствует кДНК hWnt11.

В настоящей работе впервые экспериментально установлено, что экспрессию белка hWnt11 в клетках линий меланомы человека, в клетках линий колоректального рака и в ряде нормальных тканей человека сопровождает альтернативный сплайсинг. Используемые в исследовании праймеры позволили детектировать четыре не описанных ранее сплайс-варианта hWnt11. Трансляция обнаруженных сплайс-вариантов потенциально приводит к образованию четырех разных белковых продуктов, отличных от полноразмерного лиганда. Полученные результаты отличаются от опубликованных ранее теоретических данных о существовании двух сплайс-вариантов hWnt11, кодирующих идентичные белковые продукты (Katoh M. & Katoh M., 2009).

В работе исследованы свойства и функциональная активность белковых продуктов двух изоформ мРНК hWnt11. Продемонстрировано, что белковые продукты исследуемых сплайс-вариантов способны связываться с гепарином, но hWnt11sp3 не секретируется, тогда как продукт трансляции hWnt11sp1 сохраняет способность секретироваться. Также белок, кодируемый сплайс-вариантом hWnt11sp1, обладает способностью взаимодействовать с секретлируемым ингибитором сигнального пути Wnt – молекулой WIF-1. В качестве критерия функциональной активности была проанализирована способность лиганда ингибировать канонический сигнальный путь Wnt. Установлено, что

образующиеся в результате альтернативного сплайсинга белки hWnt11sp1 и hWnt11sp3 не обладают той же функциональной активностью, что и полноразмерный лиганд.

Теоретическое и практическое значение работы.

В работе впервые установлено, что при экспрессии лиганда hWnt11 происходит альтернативный сплайсинг, который приводит к образованию изоформ мРНК, кодирующих белки с разными свойствами. Продукты трансляции выявленных изоформ лишены функциональной активности лиганда hWnt11, однако в разной степени сохраняют свойства, характерные для полноразмерного белка. Тот факт, что новые изоформы мРНК представляют собой кодирующие последовательности, а транслируемые с них белки обладают различными свойствами, дает основание предполагать, что изоформы лиганда hWnt11 имеют индивидуальные функции. Дальнейшее изучение функций белков, образующихся в результате альтернативного сплайсинга hWnt11, является перспективным направлением исследований.

Обнаруженный в данной работе феномен альтернативного сплайсинга, сопровождающего экспрессию лиганда hWnt11, не только важен для понимания механизмов канцерогенеза, но и может иметь значение для разработки противоопухолевых препаратов в будущем.

Личное участие автора в проведении исследований:

Автором самостоятельно выполнен основной объем исследований, проведены обработка и анализ полученных экспериментальных данных, подготовлен иллюстративный материал, сформулированы основные положения диссертации, составляющие её новизну и практическую значимость, а также подготовлены материалы публикаций в научных журналах. Неоценимую помощь при обсуждении и интерпретации полученных результатов оказал с.н.с., к.б.н. Кибардин А.В. (ИБГ РАН, Москва), имена остальных соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на 10 всероссийских и международных школах и конференциях в том числе Moleda Summer School “Non-viral gene transfer into muscle and skin” (Франция, 2007), IV Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Казань, Россия, 2009), EMBO Molecular Medicine Workshop “Invasive Growth: a Genetic Programme for Stem Cell and Cancer” (Турин, Италия, 2009), International symposium “Control of gene expression and cancer” (Москва, Россия, 2010) и других.

Публикации

По результатам диссертационной работы опубликованы 17 печатных работ, из них три – статьи в рецензируемых российских журналах.

Структура и объем диссертации

Диссертация включает разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы. Материал диссертации изложен на 102 листах машинописного текста, содержит 24 рисунка и одно приложение. Библиографический список включает 231 работу.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Экспрессия лиганда hWnt11 наблюдается в различных клеточных линиях меланомы человека

Анализ экспрессии гена *hWnt11* проводили методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР). Из клеточных линий меланомы человека была выделена РНК, которую использовали в качестве матрицы для синтеза первых цепей кДНК. Полученные кДНК послужили матрицей для полимеразной цепной реакции. ОТ-ПЦР анализ проводили с использованием двух пар праймеров (Рисунок 1). Пара праймеров AF+CR была сконструирована таким образом, чтобы участки гена, которым они комплементарны, располагались в разных экзонах. Ожидаемый размер продукта ПЦР при использовании этих праймеров и кДНК *hWnt11* в качестве матрицы составляет около 260 п.н. Праймер BF сконструирован таким образом, что праймеры BF и CR фланкируют последовательности, которые располагаются в разных, причем не соседних экзонах. Ожидаемый размер продукта ПЦР при использовании праймеров BF+CR и кДНК *hWnt11* в качестве матрицы составляет 739 п.н.

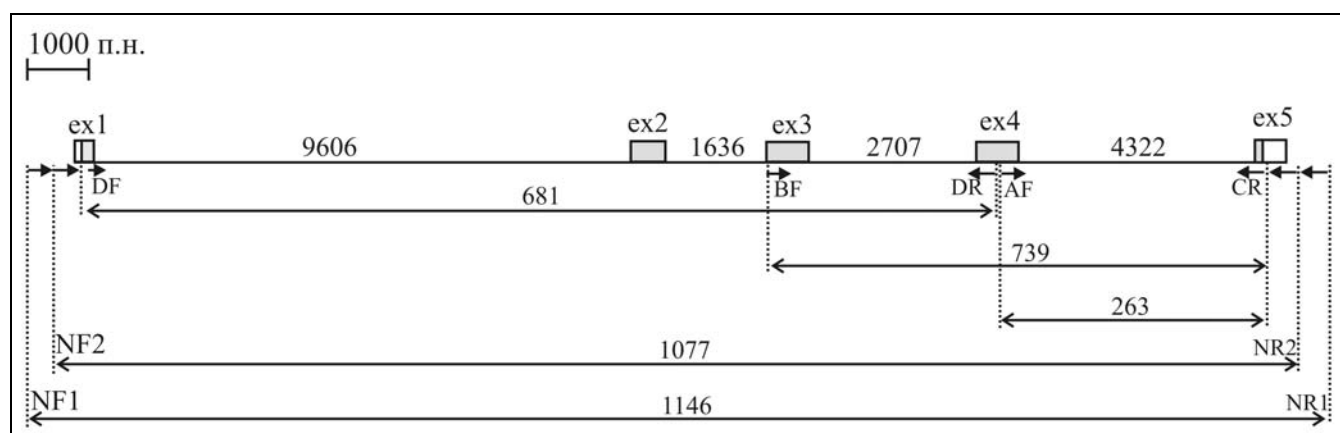


Рисунок 1. Схема структуры гена *hWnt11* с указанием экзонов (ex1-ex5) и расположением праймеров, использованных для ОТ-ПЦР анализа и гнездовой ПЦР.

В результате ОТ-ПЦР анализа экспрессии *hWnt11* было обнаружено, что при использовании пары праймеров AF+CR, соответствующих 3'-области кДНК *hWnt11*, детектируется ПЦР-продукт, размер которого соответствует расчетной величине – 263 п.н. Соответствие амплифицированного фрагмента последовательности кДНК *hWnt11* было подтверждено секвенированием ампликона, полученного в результате ПЦР. Данные, представленные на рисунке 2 (А), позволяют сделать вывод об экспрессии лиганда в девяти из двенадцати исследованных клеточных линий меланомы человека. В трех линиях ПЦР-продукт не наблюдается. В одном случае амплифицируемый фрагмент детектируется в виде слабо выраженной полосы. Таким образом, показано, что в исследованных клеточных линиях меланомы экспрессия лиганда *hWnt11* является частым событием.

В результате ОТ-ПЦР с использованием праймеров BF+CR наблюдается набор ПЦР-фрагментов различного размера. Размер наибольшего ампликона (отмечен верхней стрелкой на рисунке 2 (Б)) соответствует расчетной величине фрагмента, который должен

амплифицироваться с последовательности, кодирующей hWnt11 (739 п.н.). Из девяти линий меланомы человека, в которых экспрессия hWnt11 детектируется при помощи пары праймеров AF+CR, в восьми клеточных линиях она подтверждается в результате ОТ-ПЦР с праймерами BF+CR. Исключением является клеточная линия Mel ME, в которой экспрессия лиганда hWnt11 методом ОТ-ПЦР с парой праймеров BF+CR не регистрируется.

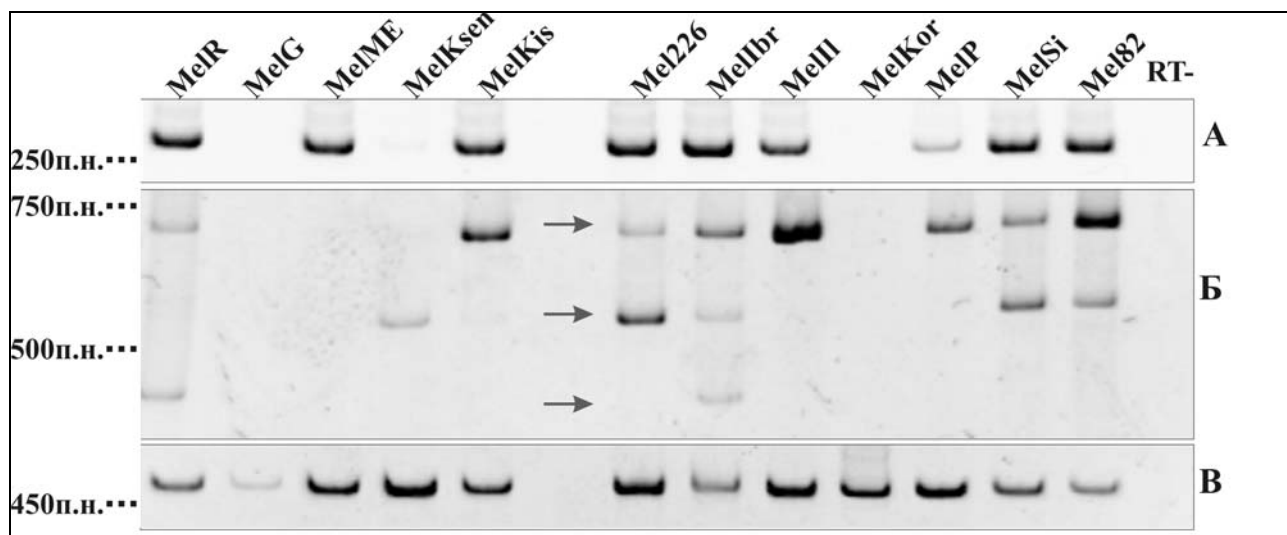


Рисунок 2. Результат ОТ-ПЦР анализа с применением двух пар праймеров: AF+CR (панель А) и BF+CR (панель Б) в клеточных линиях меланомы человека. Стрелками отмечены области на электрофореграмме, в которых располагаются ампликоны различных размеров. Для контроля количества анализируемого материала использовали праймеры к гену глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (панель В); для отрицательного контроля - реакцию без добавления обратной транскриптазы (RT-).

Ампликоны меньшей величины, чем расчетная (739 п.н.) наблюдаются в продуктах ПЦР с кДНК из 6 исследованных линий. В пяти клеточных линиях меланомы человека (Mel R, Mel 226, Mel Ibr, Mel Si и Mel 82) детектируется как большой (739 п.н.) ампликон, так и ампликоны размера 575 и 463 п.н. В клеточной линии Mel Ksen наблюдается только ПЦР-продукт, соответствующий размеру 575 п.н. Чтобы подтвердить соответствие последовательности наблюдаемых ПЦР-продуктов кДНК hWnt11, фрагменты каждого размера секвенировали.

В клеточных линиях меланомы человека были детектированы транскрипты hWnt11 разного размера. Чтобы установить, характерно ли данное явление только для клеток меланомы, или в опухолевых клетках другого происхождения также образуются разные транскрипты hWnt11, были исследованы клетки линий колоректального рака Т84 и НТ29.

Экспрессия лиганда hWnt11 в клетках линий колоректально рака

Экспрессия лиганда hWnt11 в клетках линий колоректального рака Т84 и НТ29 была исследована методом ОТ-ПЦР с использованием двух пар праймеров: AF+CR к 3'-области

и DF+DR к 5'- и центральной области кДНК hWnt11 (Рисунок 1). Результаты ОТ-ПЦР с применением пар праймеров AF+CR и DF+DR приведены на рисунке 3.

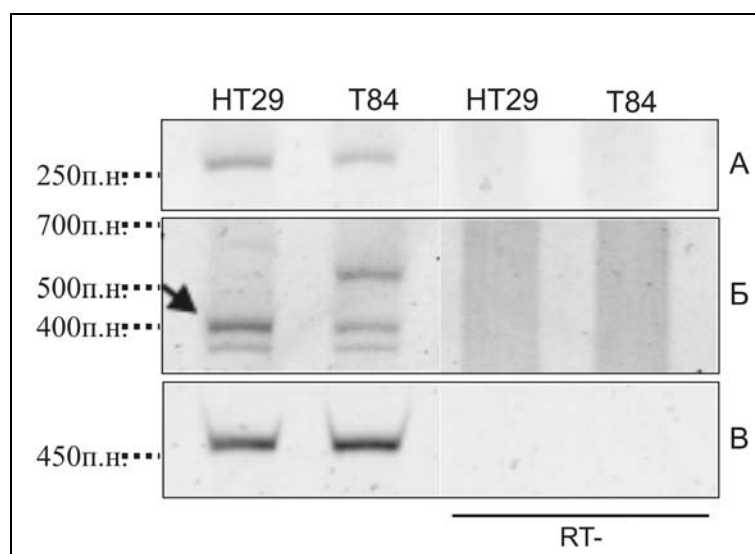


Рисунок 3. Результат ОТ-ПЦР анализа с применением пар праймеров: AF+CR (панель А) и DF+DR (панель Б) в клетках линий карциномы кишечника HT29 и Т84. Стрелкой на электрофореграмме отмечен ампликон, выбранный для исследования. Для контроля количества анализируемого материала использовали праймеры к гену глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (панель В); для отрицательного контроля - реакцию без добавления обратной транскриптазы (RT-).

Результаты ОТ-ПЦР анализа с парой праймеров AF+CR дают основания полагать, что в обеих клеточных линиях экспрессируется лиганд hWnt11, так как на электрофореграмме можно наблюдать полосу, соответствующую ожидаемому размеру ПЦР-продукта – 263 п.н. (Рисунок 3А). В то же время, при использовании пары праймеров DF+DR зарегистрирован набор ПЦР-фрагментов различного размера, как и при исследовании клеточных линий меланом человека (Рисунок 3Б). Среди продуктов ПЦР с кДНК клеток линий HT29 и Т84 присутствуют ампликоны размером 517, 405 и 342 п.н. При этом в клетках линий карциномы кишечника HT29 не наблюдается ампликон, соответствующий по размеру расчетной полноразмерной последовательности. Соответствие нуклеотидной последовательности амплифицированных фрагментов кДНК hWnt11 подтверждено секвенированием. В результате ОТ-ПЦР анализа установлено, что в клетках колоректального рака, как и в клетках меланомы, детектируются ампликоны разного размера. Вероятно, присутствие ампликонов разного размера свидетельствует об образовании разных транскриптов hWnt11.

Чтобы установить, является ли образование ампликонов разного размера при ОТ-ПЦР анализе экспрессии hWnt11 опухоль-специфичным явлением или встречается и в норме, была исследована экспрессия лиганда hWnt11 в образцах нормальной ткани.

Экспрессия лиганда *hWnt11* в клетках нормальных тканей человека

Исследование экспрессии лиганда *hWnt11* в клетках нормальных тканей человека было проведено методом ОТ-ПЦР анализа с использованием праймеров AF+CR и BF+CR (Рисунок 1). Была исследована тотальная РНК, выделенная из легких, плаценты, прямой кишки, жировой ткани, лимфоцитов, эмбриональных стволовых клеток. Результаты представлены на рисунке 4.

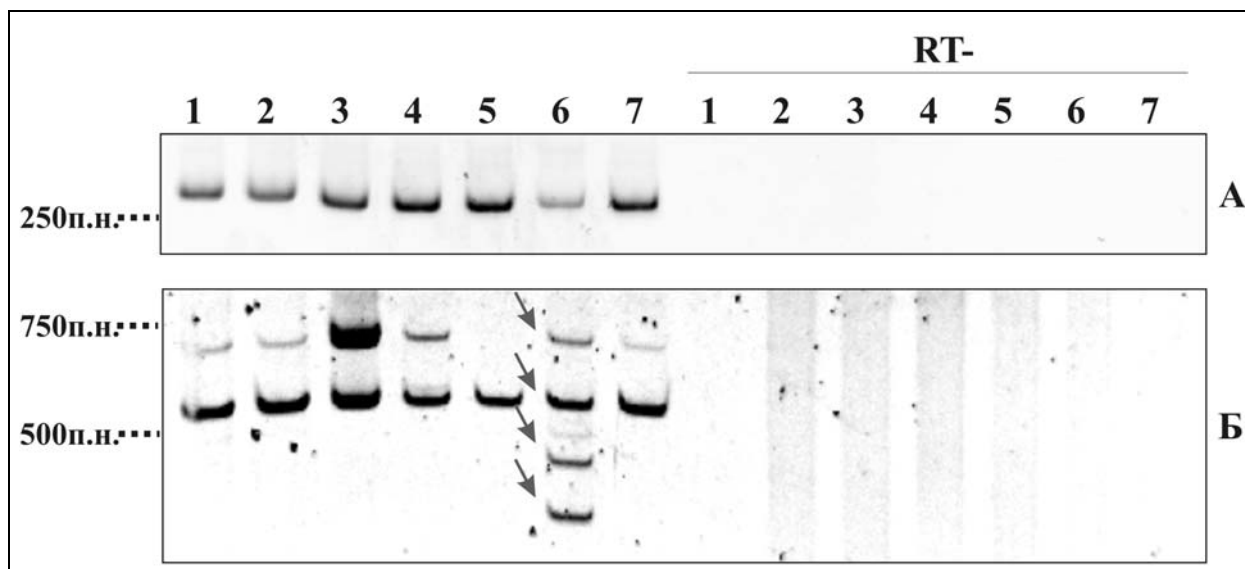


Рисунок 4. Результат ОТ-ПЦР анализа экспрессии лиганда *hWnt11* с применением двух пар праймеров: AF+CR (панель А) и BF+CR (панель Б) в клетках нормальных тканей человека. Цифры обозначают источник РНК: 1,2-эмбриональные стволовые клетки, 3-лимфоциты, 4-плацента, 5-жировая ткань, 6-легкие, 7-прямая кишка. Стрелками отмечены четыре ПЦР-продукта разного размера, амплифицируемые в легких. Отрицательный контроль – реакция без добавления обратной транскриптазы (RT-).

В результате ОТ-ПЦР анализа экспрессии лиганда *hWnt11* в образцах нормальных тканей человека установлено, что использование пары праймеров AF+CR приводит к амплификации ПЦР-продукта, размер которого соответствует расчетной величине 263 п.н. (Рисунок 4А). Это дает основание утверждать, что во всех исследованных тканях происходит экспрессия лиганда *hWnt11*. Однако в результате ОТ-ПЦР с использованием пары праймеров BF+CR амплифицируется набор фрагментов разного размера. В эмбриональных стволовых клетках, лимфоцитах, клетках плаценты и прямой кишки детектируется два ампликона размером 739 и 575 п.н. В клетках жировой ткани наблюдается ампликон размера 575 п.н., и отсутствует ПЦР-продукт, соответствующий расчетной величине (739 п.н.). Наибольший интерес представляет результат ОТ-ПЦР анализа РНК из клеток человеческого легкого. При использовании пары праймеров BF+CR происходит амплификация четырех фрагментов различной величины: 739, 575, 463 и 400 п.н. Самый большой ПЦР-продукт по своему размеру соответствует расчетной величине полноразмерного лиганда (739 п.н.). Соответствие амплифицированных фрагментов последовательности кДНК *hWnt11* было подтверждено секвенированием выделенных из геля и очищенных ПЦР-продуктов.

Исследование экспрессии лиганда hWnt11 в клетках нормальных тканей человека, проведенное методом ОТ-ПЦР, показало, что образование транскриптов hWnt11 разного размера не является опухоль-специфичным явлением. Во всех исследованных образцах детектируются ПЦР-продукты, имеющие размер меньше расчетного. Более того, в жировой ткани не наблюдается ампликон ожидаемого размера (739 п.н.). В большинстве исследованных образцов нормальной ткани человека (пять из семи) присутствуют два ампликона разной величины. В клетках ткани человеческого легкого детектированы четыре ПЦР-продукта разного размера.

Экспрессия лиганда hWnt11 сопровождается альтернативным сплайсингом

In silico анализ последовательности амплифицированных фрагментов позволил сделать заключение об их структуре. Последовательность всех исследуемых ампликонов соответствует кДНК hWnt11 (GenBank № BC113386.1). Однако только те ПЦР-фрагменты, размер которых соответствует расчетному (739 п.н. для праймеров BF+CR и 681 п.н. для праймеров DF+DR), имеют последовательность идентичную кДНК hWnt11. Изоформы мРНК, которые детектируются в результате ОТ-ПЦР в виде ПЦР-продуктов другого размера, характеризуются различными делециями и/или сдвигом рамки считывания. На основании результатов *in silico* анализа был сделан вывод об альтернативном сплайсинге, происходящем при экспрессии лиганда hWnt11.

Вопреки предположениям о возможной опухоль-специфичной природе разнообразия транскриптов hWnt11, наибольшее количество вариантов детектируется в ткани человеческого легкого – четыре амплифицированных фрагмента (Рисунок 4Б). Наибольший ампликон соответствует по размеру расчетной величине, и его нуклеотидная последовательность идентична кДНК hWnt11 (GenBank № BC113386.1).

Нуклеотидная последовательность фрагмента, который при ОТ-ПЦР анализе с использованием праймеров BF+CR детектируется в виде ПЦР-продукта величиной 463 п.н., также соответствует кДНК hWnt11. Однако, по сравнению с полноразмерной кДНК, имеется делеция размером 276 п.н., которая идентична части последовательности третьего и четвертого экзонов гена *hWnt11* (Рисунок 5А). *In silico* анализ показывает, что делеция не приводит к сдвигу рамки считывания. Нуклеотидная последовательность данного фрагмента депонирована в NCBI GenBank (№ JF800675) в качестве сплайс-варианта hWnt11sp3. Размер предполагаемого альтернативного белкового продукта соответствует 262 аминокислотным остаткам и имеет расчетную молекулярную массу в 29.5 кДа (Рисунок 5Б).

В результате ОТ-ПЦР анализа экспрессии hWnt11 с использованием праймеров BF и CR детектируется ампликон размером 575 п.н. (Рисунки 2 и 4). Однако, применение других праймеров (DF+DR, NF+NR) и *in silico* анализ последовательности амплифицированных фрагментов выявили, что существуют два варианта мРНК, которые при использовании праймеров BF+CR детектируются как один ампликон. Обнаруженные изоформы мРНК hWnt11 были названы hWnt11sp1 и hWnt11sp2.

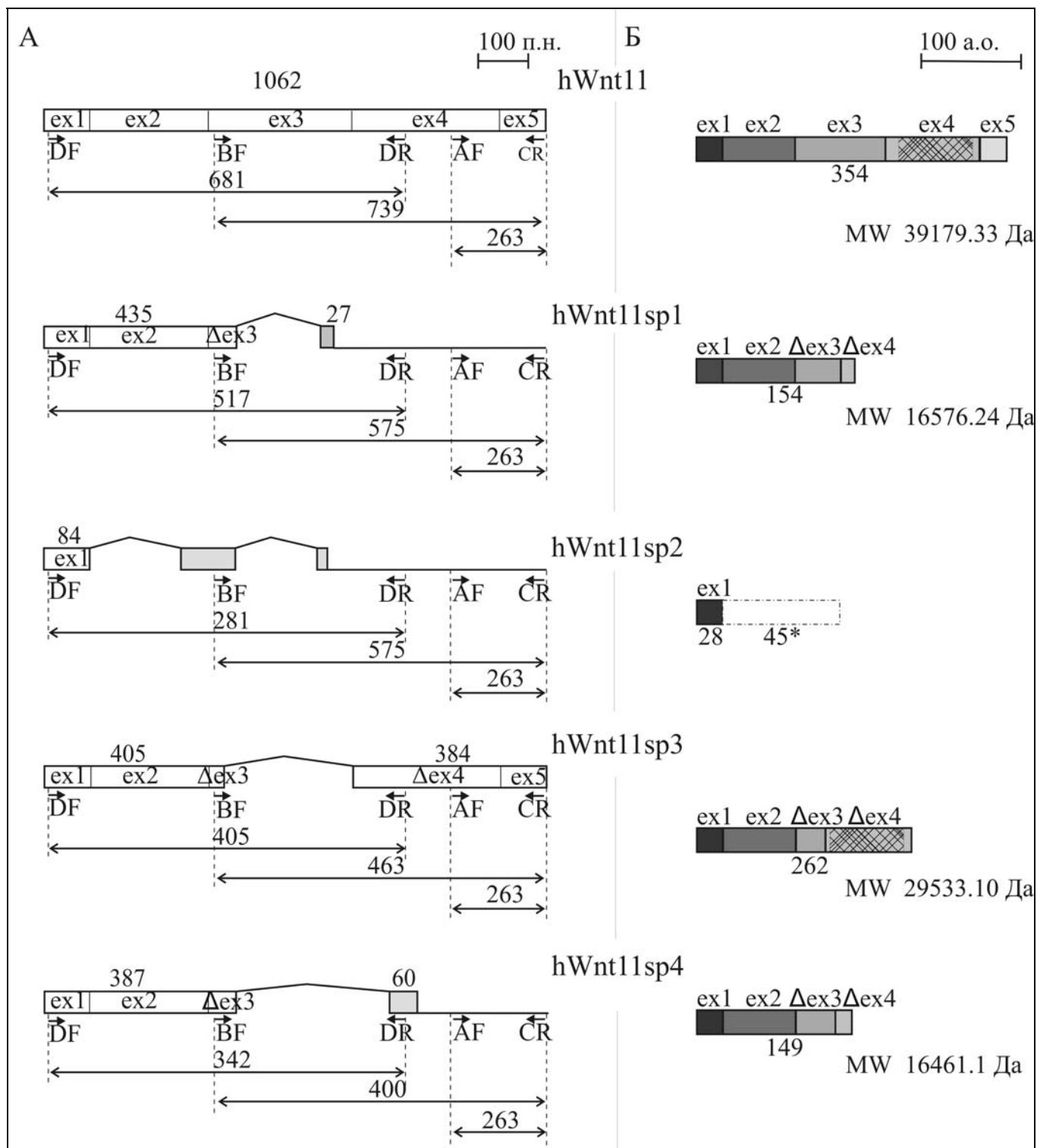


Рисунок 5. А – схема структуры кодирующей области изоформ мРНК hWnt11 с указанием экзонов (ex1-ex5) и расположением праймеров, использованных для ОТ-ПЦР анализа. Серым закрашены области, соответствующие сдвигу рамки считывания. Б – схема белковых продуктов сплайс-вариантов с указанием экзонов (ex1-ex5). Заштрихованная область соответствует фрагменту, который использовали для иммунизации.

Благодаря *in silico* анализу последовательности сплайс-варианта hWnt11sp2 установлено, что в ходе альтернативного сплайсинга мРНК лишается последовательности, кодирующей функциональный участок белка. Это обусловлено сдвигом рамки считывания. Идентичным исходной последовательности остается только участок, соответствующий первому экзону, далее возникает стоп-кодон. Даже если предположить, что, благодаря сдвигу рамки считывания, формируется кодирующая последовательность, её свойства будут кардинально отличаться от свойств лиганда hWnt11, и их непосредственное сравнение нецелесообразно. Подробное изучение сплайс-варианта hWnt11sp2 и его возможных белковых продуктов представляет собой объект самостоятельного исследования, которое было вынесено за рамки данной работы.

Согласно результатам анализа *in silico*, сплайс-вариант hWnt11sp1 представляет собой неизмененные первый и второй экзоны, третий экзон, лишенный участка размером 162 нуклеотидов, и фрагмент четвертого экзона. Участок четвертого экзона составляют всего лишь 27 п.н., причем в результате альтернативного сплайсинга происходит сдвиг рамки считывания (Рисунок 5А). Результаты *in silico* анализа дают основания предполагать, что белковый продукт этого сплайс-варианта отличается от полноразмерного hWnt11 не только делецией, но и последовательностью из девяти аминокислот. Нуклеотидная последовательность данной изоформы депонирована в NCBI GenBank (№ JQ716612). Предполагаемый белковый продукт альтернативного сплайсинга образован 154 аминокислотными остатками и имеет предполагаемую молекулярную массу в 16.5 кДа (Рисунок 5Б).

Сплайс-вариант hWnt11sp4 образован в результате частичной делеции третьего и четвертого экзонов, а также сдвига рамки считывания, обуславливающего последовательность последних 20 аминокислот. Нуклеотидная последовательность, соответствующая hWnt11sp4, депонирована в NCBI GenBank (№ JQ716613). Продукт трансляции hWnt11sp4 образован 149 аминокислотными остатками, из которых первые 129 идентичны последовательности hWnt11sp1 (всего 154 а.о.).

Таким образом, в данной работе впервые экспериментально установлено существование четырех сплайс-вариантов, образующихся при экспрессии лиганда hWnt11. В результате трансляции обнаруженных изоформ мРНК hWnt11 предполагается образование четырех белковых продуктов, которые отличаются от полноразмерного лиганда.

Получение антител к белку hWnt11, создание экспрессионных конструкций

Для изучения функций и паттерна экспрессии исследуемого лиганда было необходимо получить антитела, специфически распознающие hWnt11. Нуклеотидную последовательность, кодирующую участок лиганда, выбранный для иммунизации «hν» (Gln231-Pro320), клонировали в плазмиды pGEX-4T-1 и pQE-30 для экспрессии в бактериальной экспрессионной системе. Нарботанные химерные белки использовали для получения антител: белок, слитый с GST, – для иммунизации кроликов, а белок, несущий 6 гистидиновых остатков, – для аффинной очистки антител из сыворотки (Рисунок 6).

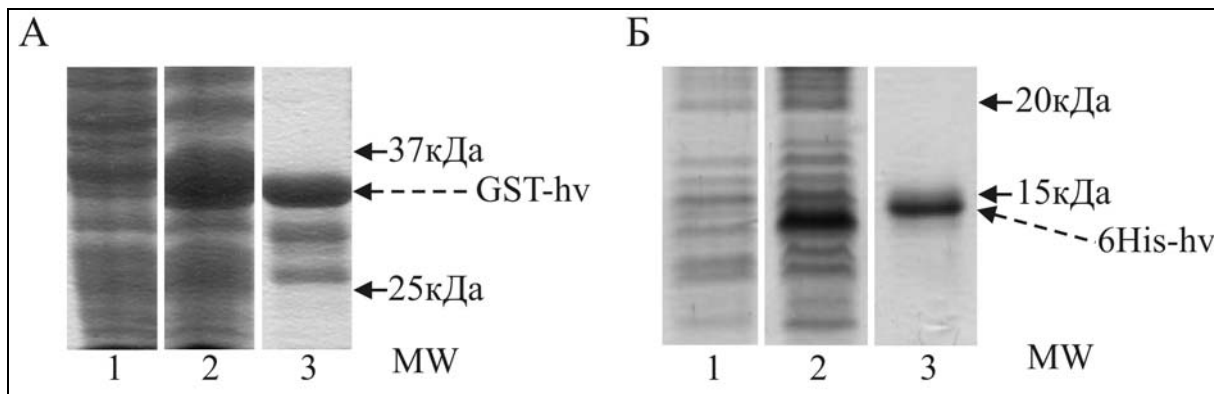


Рисунок 6. Электрофорез в ДСН-ПААГ продуктов экспрессии иммуногенного фрагмента лиганда hWnt11 в бактериальной экспрессионной системе. Порядок нанесения: 1 – лизат неиндуцированных бактерий; 2 – лизат бактерий, индуцированных ИПТГ; 3 – очищенный белок. Бактерии трансформированы плазмидами pGEX4T1-hv (А) и pQE30-hv (Б).

Для исследования свойств изоформ лиганда hWnt11 были созданы экспрессионные конструкции на основе плазмиды pсDNA5/FRT/ТО, кодирующие сплайс-вариант hWnt11sp3, полноразмерный лиганд и фрагмент hWnt11, не содержащий С-концевой участок после Cys283 (hWnt11 С). Вариант лиганда семейства Wnt, лишенный С-концевого участка, способен связываться со специфическими рецепторами, но не имеет функциональной активности и считается доминантно-негативной формой лигандов семейства Wnt. Исследование свойств hWnt11sp1 осложнено тем, что аминокислотная последовательность белкового продукта этого сплайс-варианта не содержит участка, детектируемого полученными антителами (Рисунок 5Б). Поэтому для исследования свойств этой изоформы создали экспрессионную конструкцию на базе pDED.

Проверку функциональности полученных экспрессионных генетических конструкций на базе pсDNA5/FRT/ТО проводили по следующей схеме: клетки линии CHO были транзитивно трансфицированы, наличие рекомбинантных белков подтверждали методом Вестерн-блот анализа, результаты которого представлены на рисунке 7.

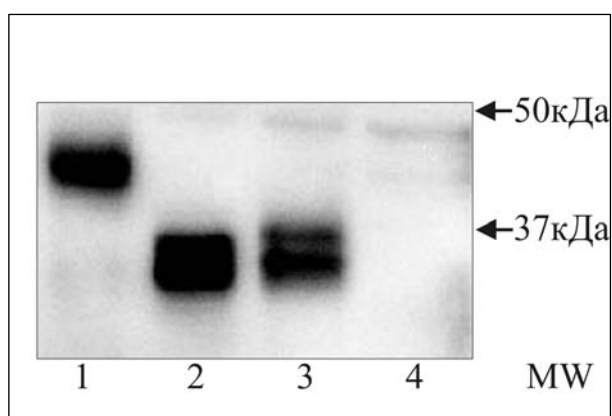


Рисунок 7. Вестерн-блот анализ функциональности экспрессионных конструкций, созданных на базе pсDNA5/FRT/ТО, и последовательностей, кодирующих hWnt11 (1), hWnt11sp3 (2) и hWnt11 С (3). Лизат нетрансфицированных клеток CHO использован в качестве отрицательного контроля (4). Используются полученные в работе антител к белку hWnt11.

В клеточных лизатах транзитивно трансфицированных клеток линии CHO зарегистрированы иммунореактивные полосы с молекулярными массами, соответствующими расчетным. На основании данных Вестерн-блот анализа сделан вывод,

что в результате трансфекции в клетках экспрессируются hWnt11, hWnt11sp3 и hWnt11 C и все эти формы hWnt11 распознаются полученными антителами.

Белковый продукт альтернативного сплайсинга hWnt11sp3 не секретируется

Лиганды семейства Wnt являются секретируемыми белками, аутокринно действующими на клетки, которые их экспрессируют, и паракринно - на соседние клетки. Белки Wnt связываются с внеклеточным матриксом, в частности с гепаран-сульфатом и гепарином. Это их свойство используется для детекции малых концентраций различных форм Wnt (Bradley R.S., Brown A.M., 1990). Метод инкубации с гепарин-сефарозой позволяет выявить присутствие исследуемого лиганда hWnt в кондиционной среде или лизате. При исследовании новых изоформ лиганда, свойства которых неизвестны, инкубация с гепарин-сефарозой позволяет ответить на вопрос, связываются ли исследуемые белки с гепарином. В случае положительного результата, инкубация с гепарин-сефарозой позволяет обнаружить присутствие исследуемых белков в кондиционной среде или лизате.

Исследование способности белкового продукта сплайс-варианта hWnt11sp3 секретироваться проводили, определяя его присутствие в кондиционной среде транзитивно трансфицированных клеток линии CHO. Связывание белков с гепарин-сефарозой выявляли методом Вестерн-блот анализа (Рисунок 8).

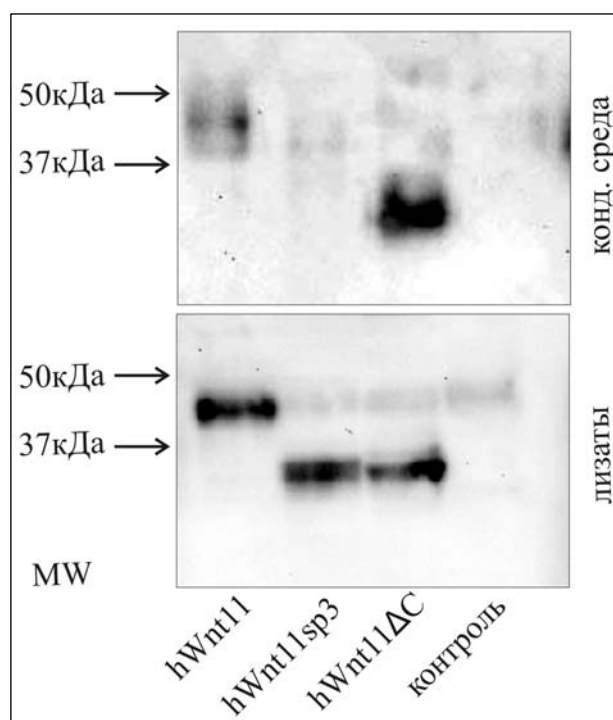


Рисунок 8. Вестерн-блот анализ связывания исследуемых форм белка hWnt11 с гепарин-сефарозой, которая проинкубирована или со средой, кондиционированной трансфицированными клетками (верхняя панель), или с лизатами клеток линии CHO, трансфицированных hWnt11-, hWnt11sp3- и hWnt11 C-кодирующими конструкциями (нижняя панель).

В качестве отрицательного контроля использованы нетрансфицированные клетки линии CHO

Оказалось, что полноразмерный и доминантно-негативный (hWnt11 C) варианты hWnt11 связываются с гепарин-сефарозой, инкубированной с кондиционной средой, и достоверно выявляются в результате Вестерн-блот анализа, в отличие от новой изоформы лиганда hWnt11sp3, чье присутствие в культуральной среде не было обнаружено. В то же время при инкубации гепарин-сефарозы с лизатами трансфицированных клеток было

обнаружено присутствие всех трех изучаемых белков во внутриклеточном компартменте. Этот факт свидетельствует о том, что все формы белка экспрессировались в результате трансфекции и что белковый продукт альтернативного сплайсинга hWnt11sp3, также как доминантно-негативная и полноразмерная формы hWnt11, способен связываться с гепарином.

Отсутствие hWnt11sp3 в кондиционной среде указывает на нарушение секреции белкового продукта соответствующего сплайс-варианта, что отличает его от полноразмерного лиганда и позволяет предположить их функциональную разницу.

В клетках линии HT29 антителами против hWnt11 выявлен набор иммунореактивных полос различной молекулярной массы

В результате ОТ-ПЦР анализа РНК из клеток линии HT29, установлено, что в этих клетках происходит альтернативный сплайсинг «неканонического» лиганда hWnt11. Подобная посттранскрипционная модификация может приводить к образованию нефункциональных мРНК. Образование нетранслируемых изоформ мРНК может быть одним из методов подавления экспрессии белка. Чтобы установить, сопровождается ли альтернативный сплайсинг лиганда hWnt11 экспрессией белковых продуктов сплайс-вариантов в нативных условиях, был проведен Вестерн-блот анализ кондиционной среды и лизатов клеток линии HT29 (Рисунок 9). Кондиционную среду и клеточные лизаты инкубировали с гепарин-сефарозой, а затем связавшиеся белки детектировали с помощью полученных в данной работе антител к лиганду hWnt11. В кондиционной среде обнаружена единственная иммунореактивная полоса с молекулярной массой, соответствующей полноразмерному hWnt11. При этом в клеточных лизатах наряду с полосой, соответствующей полноразмерному лиганду, обнаружен ряд иммунореактивных полос с меньшими, чем у полноразмерного hWnt11, молекулярными массами.

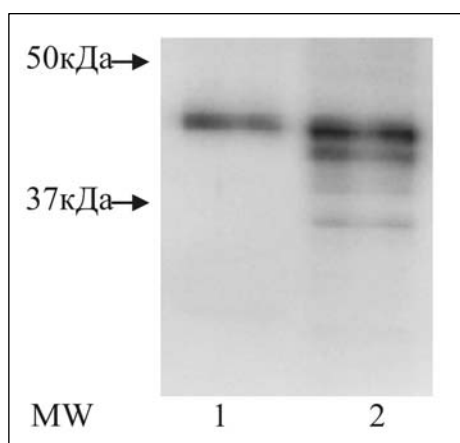


Рисунок 9. Экспрессия лиганда hWnt11 клетками линии карциномы кишечника HT29. Вестерн-блот анализ связывания изоформ лиганда hWnt11 с гепарин-сефарозой, проинкубированной с кондиционной средой (1) или лизатом клеток линии HT29 (2).

В результате Вестерн-блот анализа установлено, что в клетках линии карциномы кишечника HT29 экспрессируется не только полноразмерный лиганд hWnt11, но и белковые продукты меньшей молекулярной массы, которые могут быть результатом альтернативного сплайсинга, происходящего в этих клетках. Эти данные согласуются с присутствием в клетках линии HT29 hWnt11-транскриптов разного размера, выявленных методом ОТ-ПЦР.

Белковый продукт альтернативного сплайсинга hWnt11sp1 сохраняет способность секретироваться

Инкубация с гепарин-сефарозой также была использована для исследования свойств белкового продукта hWnt11sp1. Клетки CHO транзиторно трансфицировали конструкциями, кодирующими полноразмерный лиганд hWnt11 и изоформу hWnt11sp1 слитые с эпитопом DED. Кондиционная среда и лизаты трансфицированных клеток были инкубированы с гепарин-сефарозой. Связывание белков с гепарин-сефарозой выявляли методом Вестерн-блот анализа (Рисунок 10).

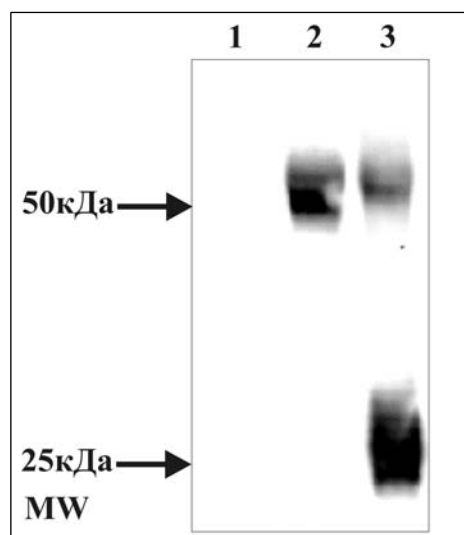


Рисунок 10. Вестерн-блот анализ присутствия изоформ hWnt11-DED и hWnt11sp1-DED в кондиционной среде. Среда, кондиционированная нативными клетками CHO (1) или клетками CHO, экспрессирующими рекомбинантный белок hWnt11-DED (2) либо hWnt11sp1-DED (3), была инкубирована с гепарин-сефарозой. Связывание белков с гепарин-сефарозой детектировано с использованием антител к эпитопу DED.

В результате анализа способности hWnt11sp1 связываться с гепарин-сефарозой и присутствия в кондиционной среде установлено следующее. Как и полноразмерный лиганд hWnt11 изоформа hWnt11sp1 связывается с гепарин-сефарозой, что свидетельствует о потенциальной способности взаимодействовать с гепарином внеклеточного матрикса. Исследуемая изоформа hWnt11sp1, также как и полноразмерный лиганд hWnt11, присутствует в кондиционной среде.

В результате данного эксперимента выявлено, что изоформа hWnt11sp1 не только сохраняет способность взаимодействовать с гепарином, но и секретировается. На следующем этапе исследования был проведен эксперимент, иллюстрирующий способность hWnt11sp1 взаимодействовать с белком WIF-1, секретруемым ингибитором сигнальных путей Wnt.

Белковый продукт сплайс-варианта hWnt11sp1 связывается с регуляторным белком WIF-1

Для исследования способности изоформ hWnt11 взаимодействовать с белком WIF-1 лизат клеток CHO, трансфицированных экспрессионными конструкциями, инкубировали с сефарозой, несущей антитела к DED-эпитопу. На втором этапе сефарозу с ковалентно пришитыми антителами и связавшимися с ними белками инкубировали с белком WIF-1. Присутствие в пробах изоформ hWnt11 и белка-партнера WIF-1 детектировали методом Вестерн-блот анализа, используя антитела против DED-эпитопа или белка WIF-1, соответственно (Рисунок 11). Чтобы исключить возможность неспецифического

связывания WIF-1 с сефарозой, использовали инкубацию с лизатом нетрансфицированных клеток CHO на первом этапе.

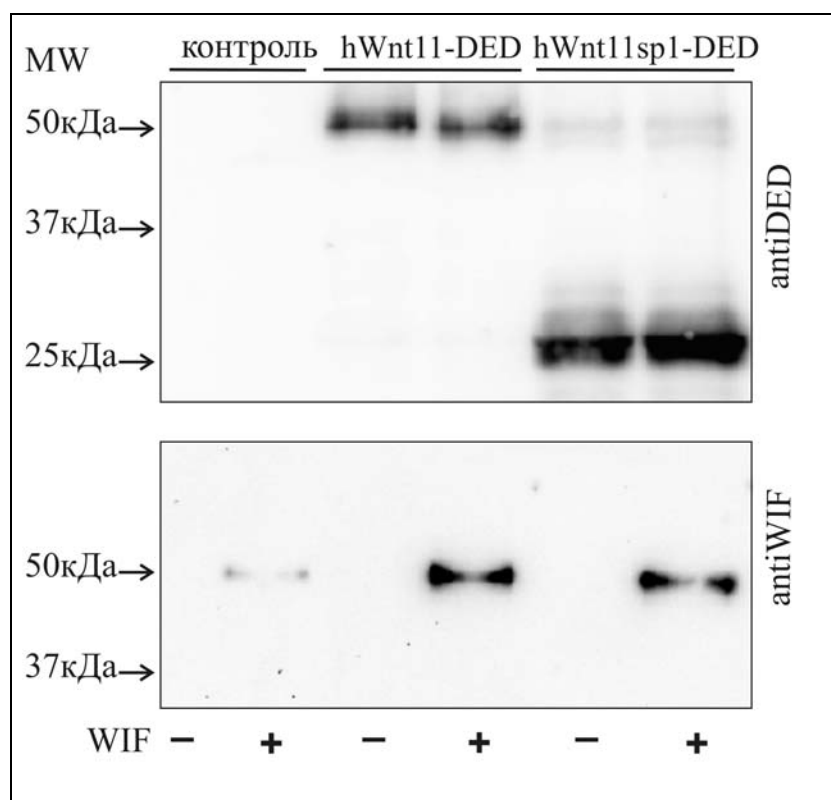


Рисунок 11. Вестерн-блот анализ связывания регуляторного белка WIF-1 с изоформами hWnt11. Детекция анти-DED антителами (верхняя панель). Детекция анти-WIF антителами (нижняя панель). Снизу указано, подвергалась ли сефароза инкубации с раствором, содержащим WIF-1 (+ и –, соответственно)

В результате эксперимента установлено, что белок WIF-1 достоверно выявляется в пробах, содержащих лизаты клеток, трансфицированных экспрессионными конструкциями. В контрольной пробе, содержащей лизат нативных клеток CHO, детектируются следовые количества WIF-1. Эти данные свидетельствуют о том, что полноразмерный белок hWnt11 и его изоформа hWnt11sp1 способны взаимодействовать с регуляторным белком WIF-1.

Исследование свойств обнаруженных сплайс-вариантов показало, что белковый продукт hWnt11sp1, также как и полноразмерный лиганд, секретируется клетками и способен взаимодействовать с веществом межклеточного матрикса – гепарином, а также с регуляторным белком WIF-1.

Исследование функциональной активности изоформ лиганда hWnt11

В результате активации неканонического сигнального пути Wnt может происходить подавление канонического сигнального пути Wnt. Поэтому в качестве критерия функциональной активности hWnt11 и новых изоформ лиганда была выбрана способность ингибировать канонический сигнальный путь Wnt.

Экспрессия лиганда *hWnt11* ингибирует активацию канонического сигнального пути *Wnt*

С целью установить влияние экспрессии белка *hWnt11* на активацию канонического сигнального пути *Wnt* был использован двойной люциферазный тест. Для эксперимента была выбрана клеточная линия меланомы человека, характеризующаяся отсутствием экспрессии *hWnt11*, – Mel G (Рисунок 2). Клетки трансфицировали плазмидой, кодирующей фермент люциферазу светлячка (*Photinus pyralis*) «ф» под TCF-зависимым промотором, и плазмидой, кодирующей люциферазу морских кишечнополостных (*Renilla reniformis*) «р». Активация канонического сигнального пути *Wnt* приводит к экспрессии генов, находящихся под контролем TCF-зависимого промотора. Ген люциферазы «ф» находится под контролем TCF-зависимого промотора, поэтому экспрессия люциферазы «ф» происходит в ответ на активацию канонического сигнального пути *Wnt*. Экспрессия люциферазы «р» происходит независимо от активации сигнальных путей *Wnt* и используется для контроля уровня трансфекции и базальной экспрессии. Активация канонического сигнального пути *Wnt* происходит в результате трансфекции клеток конструкцией, кодирующей лиганд *hWnt3a*, и детектируется, благодаря увеличению уровня относительной биолуминесценции. Воздействие на канонический сигнальный путь *Wnt* производили путем котрансфекции плазмидой, кодирующей лиганд *hWnt11*. Данный эксперимент показал, что в результате экспрессии рекомбинантного *hWnt11* не происходит активация канонического сигнального пути *Wnt* (рисунок 12).

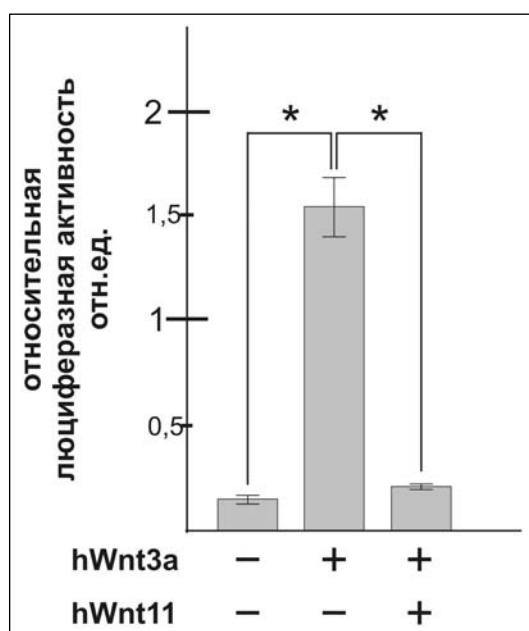


Рисунок 12. Результат двойного люциферазного теста: активация канонического сигнального пути происходит вследствие экспрессии рекомбинантного лиганда *hWnt3a* и сопровождается увеличением уровня относительной люциферазной активности. Котрансфекция конструкцией, кодирующей *hWnt11*, приводит к подавлению канонического сигнального пути (*отмечены достоверно отличающиеся значения; $p \leq 0,05$ U-test)

В результате двойного люциферазного теста установлено, что трансфекция конструкцией, кодирующей лиганд *hWnt3a*, приводит к повышению уровня относительной биолуминесценции. Котрансфекция плазмидами, кодирующими *hWnt3a* и *hWnt11*, приводит к понижению уровня относительной биолуминесценции. Таким образом, есть основания утверждать, что экспрессия рекомбинантного *hWnt11* ингибирует активацию канонического сигнального пути, происходящую в результате экспрессии лиганда *hWnt3a*.

Полученный результат согласуется с литературными данными о способности «неканонического» лиганда hWnt11 ингибировать канонический сигнальный путь Wnt.

Экспрессия эндогенного hWnt11 подавляет активацию канонического сигнального пути Wnt

С целью изучения эффекта, оказываемого ингибированием экспрессии эндогенного «неканонического» лиганда hWnt11 на активацию канонического сигнального пути Wnt, был использован метод, основанный на явлении РНК-интерференции. Чтобы блокировать естественную экспрессию hWnt11 в клетках линии меланомы человека, использовали трансфекцию конструкцией, кодирующей первичный транскрипт микроРНК, комплементарной мРНК лиганда hWnt11. Расчет кодирующей нуклеотидной последовательности производили с помощью программного обеспечения, доступного на сайте компании Invitrogen. Были разработаны три варианта последовательности, кодирующей пре-микроРНК к разным областям мРНК hWnt11. Плазмида, далее условно обозначаемая «102», содержит последовательность, кодирующую пре-микроРНК комплементарную 5'-области мРНК hWnt11, плазмиды «939» и «958» содержат последовательности, кодирующие пре-микроРНК, комплементарные 3'-области мРНК лиганда hWnt11 (Рисунок 13). Плазмиды, содержащие данные последовательности были созданы с помощью набора Block It (Invitrogen).

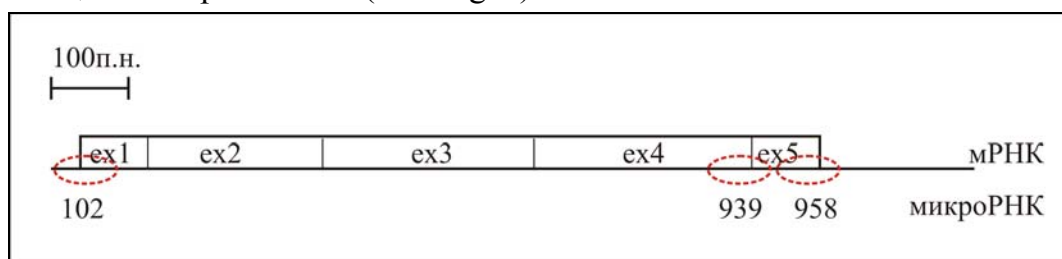


Рисунок 13. Схема расположения участков мРНК hWnt11, к которым образуются микроРНК в результате трансфекции клеток плазмидами «102», «939» и «958».

Клетки линии СНО трансфицировали смесью из трех плазмид. Чтобы проверить функциональную активность созданных конструкций, клетки трансфицировали плазмидой, кодирующей hWnt11, и одной из конструкций, кодирующих первичные транскрипты микроРНК. Также трансфекционная смесь включала плазмиду, содержащую ген зеленого флуоресцентного белка (GFP), по присутствию которого в клеточном лизате можно установить эффективность трансфекции и специфичность воздействия микроРНК. Для контроля количества анализируемого материала использовали окрашивание антителами к α -тубулину. В качестве отрицательного контроля были использованы лизаты нетрансфицированных клеток линии СНО. В них не детектируется лиганд hWnt11 и отсутствует GFP. Чтобы удостовериться, что появление в клетке микроРНК не влияет на экспрессию лиганда hWnt11, были использованы плазмиды «NEG» и «176», обеспечивающие образование неспецифических микроРНК. Эффективность трансфекции

полученными плазмидами и её влияние на уровень экспрессии гена hWnt11 тестировали с помощью Вестерн-блот анализа (Рисунок 14).

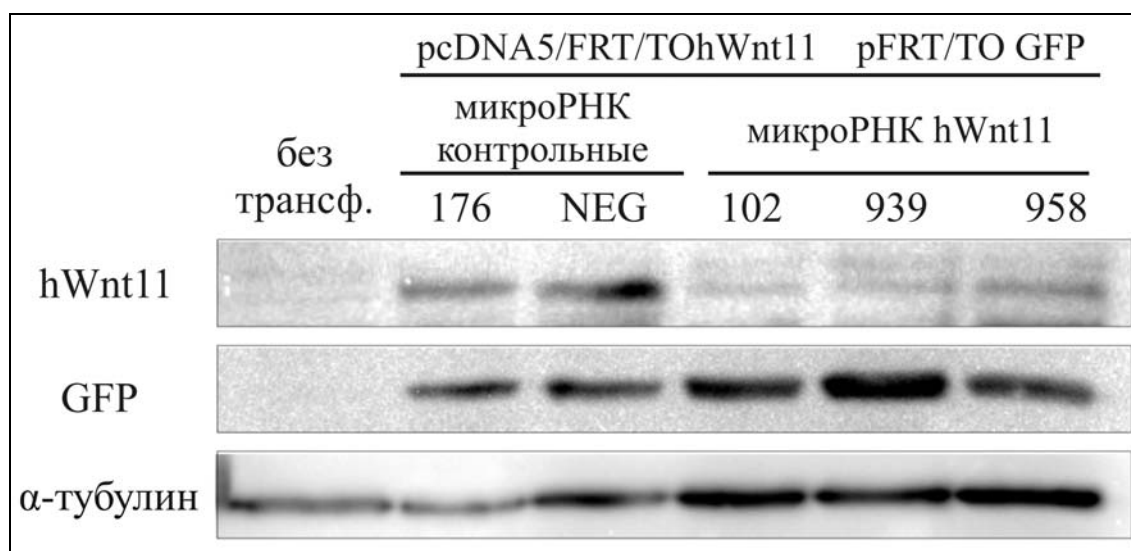


Рисунок 14. Вестерн-блот анализ экспрессии hWnt11 в клетках, трансфицированных конструкциями, кодирующими пре-микроРНК к мРНК hWnt11 (102, 939, 958) и неспецифические пре-микроРНК (176 и NEG), и в контрольных клетках. Были использованы антитела против hWnt11, GFP (контроль эффективности трансфекции) и α-тубулина (контроль количества нанесенного материала).

Результат Вестерн-блот анализа клеток, трансфицированных контрольными плазмидами «NEG» и «176», дает основания утверждать, что трансфекция проходит успешно, но подавления экспрессии лиганда hWnt11 не происходит. В случае с трансфекцией плазмидами «102», «939» и «958» образуются микроРНК, комплементарные мРНК лиганда hWnt11. На основании результатов Вестерн-блот анализа лизатов клеток, трансфицированных этими плазмидами, можно сделать вывод, что происходит подавление экспрессии лиганда hWnt11. Тот факт, что в результате Вестерн-блот анализа детектируется зеленый флуоресцентный белок, в том числе и в тех клетках, которые были трансфицированы плазмидами «102», «939» и «958», свидетельствует о том, что образующиеся микроРНК специфичны и ингибируют только продукцию целевого белка - hWnt11 (Рисунок 14).

Для выявления влияния эндогенного лиганда hWnt11 на канонический сигнальный путь использовали двойной люциферазный тест. В качестве контроля эффекта котрансфекции конструкциями, кодирующими пре-микроРНК, была использована котрансфекция плазмидой «176», кодирующей первичный транскрипт микроРНК, неспецифичной к мРНК hWnt11. Тест проводили трансфицируя клетки линии меланомы человека, в которой методом ОТ-ПЦР ранее детектировали экспрессию лиганда hWnt11, Mel 1L (Рисунок 2).

В результате трансфекции последовательно, кодирующей hWnt3a, увеличение уровня относительной люциферазной активности не происходит. В случае котрансфекции плазмидами, кодирующими первичный транскрипт микроРНК специфичной к

«неканоническому» лиганду детектируется более высокий уровень относительной билюминесценции (следствие люциферазной активности). В результате котрансфекции контрольной плазмидой «176» рост относительной билюминесценции не является статистически достоверным. Рост уровня относительной билюминесценции происходит в результате активации канонического сигнального пути, обусловленной транскрипцией TCF-зависимого гена люциферазы «ф». Отсутствие увеличения уровня относительной люциферазной активности в результате трансфекции последовательностью, кодирующей hWnt3a, и увеличение уровня относительной люциферазной активности в результате котрансфекции с плазидами «102» и «939» свидетельствуют об активации канонического сигнального пути в случае подавления экспрессии hWnt11 (Рисунок 15).

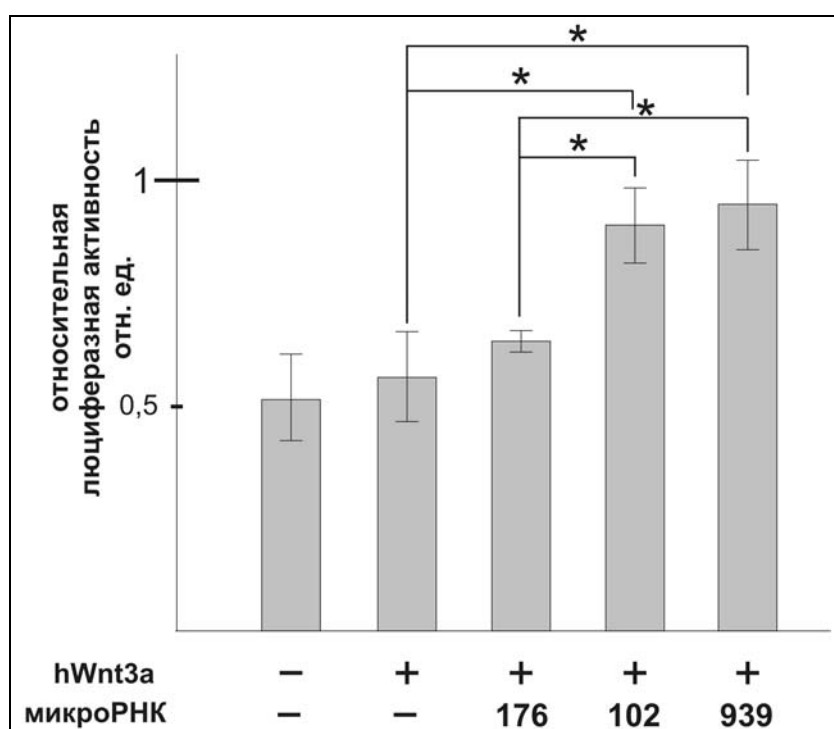


Рисунок 15. Подавление экспрессии эндогенного лиганда hWnt11 приводит к активации канонического сигнального пути Wnt. Результат двойного люциферазного теста: активация канонического сигнального пути происходит в результате экспрессии рекомбинантного лиганда hWnt3a и сопровождается увеличением уровня относительной билюминесценции; котрансфекция последовательностями, кодирующими пре-микроРНК к hWnt11 (939 и 102) и контрольную пре-микроРНК (176) (*отмечены достоверно отличающиеся значения; $p \leq 0,05$ U-test)

Тот факт, что ингибирование экспрессии эндогенного лиганда hWnt11 приводит к активации канонического сигнального пути Wnt, означает что, в случае экспрессии hWnt11 этот лиганд подавляет активацию канонического сигнального пути Wnt.

Исследование функциональной активности сплайс-вариантов лиганда hWnt11

Способность белковых продуктов альтернативного сплайсинга hWnt11 подавлять активацию канонического сигнального пути оценивали с помощью двойного

люциферазного теста. Клетки линии меланомы человека Mel P трансфицировали репортерной и контрольной плазмидами «ф» и «р», соответственно. Активацию канонического сигнального пути Wnt осуществляли путем трансфекции экспрессионной конструкцией, кодирующей лиганд hWnt3a, и детектировали уровень относительной люциферазной активности (биолюминесценции). Влияние экспрессии изоформ лиганда hWnt11 на активацию канонического сигнального пути Wnt выявляли путем котрансфекции экспрессионными конструкциями, кодирующими hWnt11, hWnt11sp1 и hWnt11sp3. Для контроля влияния котрансфекции на уровень относительной биолюминесценции производили котрансфекцию пустым вектором (Рисунок 16).

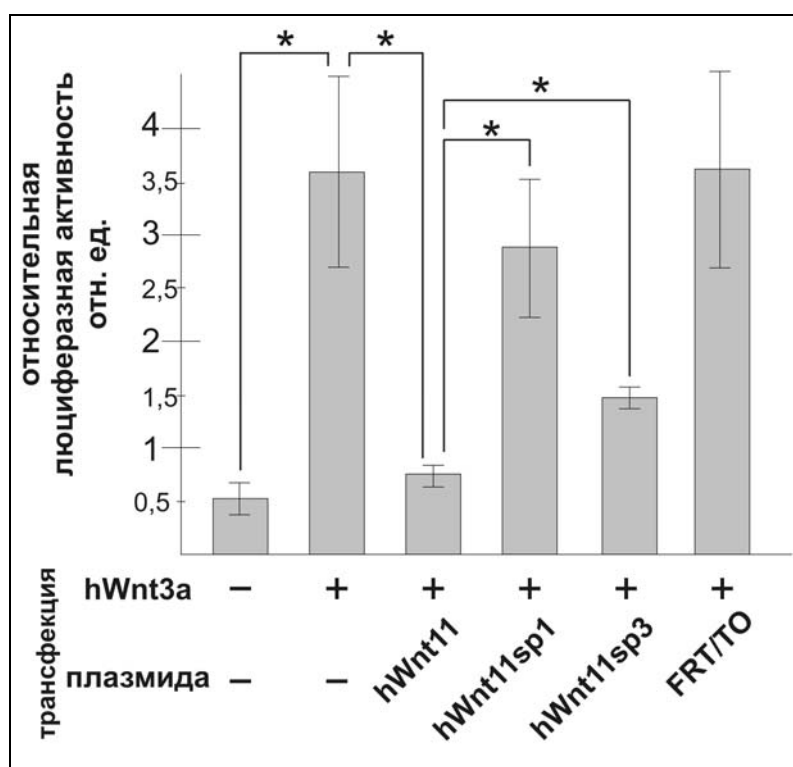


Рисунок 16. Результат двойного люциферазного теста: активация канонического сигнального пути происходит в результате экспрессии рекомбинантного лиганда hWnt3a и сопровождается увеличением уровня относительной люциферазной активности. Котрансфекция конструкцией, кодирующей hWnt11, приводит к подавлению канонического сигнального пути, котрансфекция конструкциями, кодирующими сплайс-варианты не оказывает влияния на активацию канонического сигнального пути как и контрольная котрансфекция пустым вектором (*отмечены достоверно отличающиеся значения; $p \leq 0,05$ U-test)

В результате трансфекции конструкцией, кодирующей hWnt3a, происходит увеличение уровня относительной биолюминесценции. Это свидетельствует о том, что в результате экспрессии лиганда hWnt3a происходит активация канонического сигнального пути. При котрансфекции плазмидой, кодирующей hWnt11, уровень относительной люциферазной активности в пять раз меньше, чем при экспрессии рекомбинантного лиганда hWnt3a без котрансфекции. Это означает, что полноразмерный лиганд hWnt11

ингибирует активацию канонического сигнального пути Wnt. В результате котрансфекции конструкциями, кодирующими hWnt11sp1 и hWnt11sp3, не происходит уменьшения уровня относительной биолюминесценции. Это свидетельствует о том, что в результате экспрессии белковых продуктов сплайс-вариантов не происходит ингибирование канонического сигнального пути Wnt. Контрольная котрансфекция пустым вектором показывает, что увеличение количества и разнообразия экзогенной ДНК не влияет на уровень относительной люциферазной активности.

Результаты двойного люциферазного теста показали, что ингибировать активацию канонического сигнального пути способен только полноразмерный лиганд hWnt11. Экспрессия в клетках модельной системы сплайс-вариантов hWnt11sp1 и hWnt11sp3 не подавляет активацию канонического сигнального пути.

Выводы

1. Экспрессия лиганда hWnt11 детектируется в 75% исследованных клеточных линий меланомы человека.
2. Впервые показано, что в опухолевых клетках и нормальных тканях существует механизм альтернативного сплайсинга лиганда hWnt11.
3. Изоформа hWnt11sp3 лиганда hWnt11, в отличие от полноразмерного белка, не является секретлируемым белком.
4. Изоформа hWnt11sp1 лиганда hWnt11 сохраняет способность секретироваться, а также взаимодействовать с секретлируемым ингибитором сигнального пути Wnt белком WIF-1.
5. Обнаруженные изоформы лиганда hWnt11, в отличие от полноразмерного белка, не способны ингибировать активацию канонического сигнального пути.

Статьи:

1. Посвятенко А.В., Кибардин А.В., Кошелев А.Ю., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Ларин С.С. Новая модельная система на основе генетически модифицированной клеточной линии карциномы кишечника мыши С26, позволяющая проведение быстрой *in vivo* оценки биологических эффектов экспрессии отдельных генов. Молекулярная медицина, 2008, № 5: 34-37

2. Куликова К.В., Посвятенко А.В., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Кибардин А.В., Ларин С.С. Внутрядерная локализация β -катенина не может считаться достаточным условием для активности канонического сигнального пути Wnt в клеточных линиях меланомы человека. Молекулярная биология, 2011, 45(5): 884–891.

3. Посвятенко А.В., Куликова К.В., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Кибардин А.В., Ларин С.С. Функциональные свойства новой изоформы лиганда Wnt11, экспрессирующей в клетках линии карциномы кишечника человека HT29. Молекулярная биология, 2012, 46(1): 129-138.

Тезисы конференций:

1. Aleksandra V. Posvyatenko, Alexey V. Kibardin, Georgii P. Georgiev and Sergei S. Larin. Timeframe limitations for inducible *in vivo* gene expression in mouse colon carcinoma model system. Moleda Summer School “Non-viral gene transfer into muscle and skin”. France, Evry-Maison Alfort -Paris, September, 16th-22th, 2007.

2. Посвятенко А.В., Кибардин А. В., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Ларин С.С. Механизмы регуляции взаимодействия сигнальных путей Wnt клеточных линиях меланомы. IV Российский симпозиум «Белки и пептиды». Казань, Россия, 23-27 июня 2009 сборник тезисов, школа молодых ученых, тезисы стендовых докладов, секция 4 «Биологическая активность. Механизм действия», с. 349.

3. A.V. Posvyatenko, A.V. Kibardin, K.V. Kulikova, N.V. Gnuchev, G.P. Georgiev, and Sergei S. Larin. Mechanisms of Wnt11 signaling pathway regulation in human melanoma cell lines. EMBO Molecular Medicine Workshop “Invasive Growth: a Genetic Programme for Stem Cell and Cancer”. Torino, Italy, September 10th-12th, 2009. Abstract book p. 52.

4. Aleksandra V. Posvyatenko, Alexey V. Kibardin, Kseniya 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”. Russia, Moscow, June 21th-25th, 2010. Proceedings, section “Cancer”, p. 75.

5. 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. Greece, Spetses, August 16th–25th, 2009.

6. 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». Россия, Звенигород, 12-16 октября 2009, сборник тезисов с. 52.

7. 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 19-23 October, 2009.

8. Kseniya 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". Russia, Moscow, June 21th-25th, 2010. Proceedings, section "Cancer", p. 76

9. 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". Russia, Moscow, June 21th-25th, 2010. Proceedings, p. 44.

10. 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, 7-10 февраля 2011г, сборник тезисов с. 10

11. 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 response. Yerevan, Armenia, 20-26 February, 2011, p. 82

12. Посвятенко А.В., Куликова К.В., Кибардин А.В., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Ларин С.С. Экспрессия сплайс-вариантов Wnt11 в клетках линии колоректального рака (HT29). VII симпозиум «Биологические основы терапии онкологических и гематологических заболеваний», Москва, 1-4 июня, 2011 г. Онкогематология №2 (2011), Стр. 49

13. Куликова К.В., Кибардин А.В., Посвятенко А.В., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Ларин С.С. Выявление роли лигандов WNT в формировании агрессивного опухолевого фенотипа линий меланомы человека. VII симпозиум «Биологические основы терапии онкологических и гематологических заболеваний», Москва, 1-4 июня, 2011 г. Онкогематология №2 (2011), Стр. 44-45

14. Кибардин А.В., Посвятенко А.В., Куликова К.В., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Ларин С.С. Изоформы лиганда Wnt11 и их функциональные свойства. VII симпозиум «Биологические основы терапии онкологических и гематологических заболеваний», Москва, 1-4 июня, 2011 г. Онкогематология №2 (2011), Стр. 40