

## ВНУТРИЯДЕРНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ $\beta$ -КАТЕНИНА НЕ МОЖЕТ СЧИТАТЬСЯ ДОСТАТОЧНЫМ УСЛОВИЕМ ДЛЯ АКТИВНОСТИ КАНОНИЧЕСКОГО СИГНАЛЬНОГО ПУТИ WNT В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2011 г. К. В. Куликова<sup>1\*</sup>, А. В. Посвятенко<sup>1</sup>, Н. В. Гнучев<sup>1</sup>, Г. П. Георгиев<sup>1</sup>,  
А. В. Кибардин<sup>1,2</sup>, С. С. Ларин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334

<sup>2</sup>Университет Осло, Центр медицинских исследований в России, Москва, 119334

Поступила в редакцию 11.03.2011 г.

Принята к печати 30.03.2011 г.

Меланома представляет собой онкологическое заболевание, поздние стадии которого практически не поддаются лечению. Множество данных свидетельствует в пользу того, что не последнюю роль в возникновении и развитии меланом играют нарушения в регуляции сигнального пути Wnt. Активация канонического пути Wnt сопровождается стабилизацией и аккумуляцией основного эффектора этого каскада —  $\beta$ -катенина — в ядре и цитоплазме. Мутации компонентов сигнального пути Wnt, стабилизирующие  $\beta$ -катенин и тем самым активирующие сигнальный путь, часто встречаются при различных видах опухолей, но для меланом подобные мутации крайне редки. Тем не менее, как в опухолевом материале, так и в клеточных линиях меланомы довольно часто наблюдают накопление  $\beta$ -катенина в ядре и цитоплазме. Цель нашего исследования состояла в выявлении взаимосвязи между локализацией  $\beta$ -катенина в клеточных линиях меланомы человека и статусом активности канонического сигнального пути Wnt в этих клеточных линиях. Десять клеточных линий меланомы человека охарактеризованы на основании следующих параметров: наличия экспрессии гена лиганда канонического сигнального пути Wnt, внутриклеточного распределения  $\beta$ -катенина и статуса активности этого сигнального пути. Показано, что внутриклеточную локализацию  $\beta$ -катенина нельзя считать достаточным условием активности канонического сигнального пути Wnt в клеточных линиях меланомы человека. Более того, в большинстве клеточных линий, для которых показана ядерная локализация  $\beta$ -катенина, канонический сигнальный путь Wnt не удалось активировать путем экзогенной экспрессии соответствующего лиганда. Клеточные линии меланомы человека отличаются как по активности канонического сигнального каскада Wnt, так и по механизмам его регуляции. Так что разработка потенциальной противоопухолевой терапии, нацеленной на данный сигнальный путь, требует знания “молекулярного портрета опухоли” — для локализации дефекта в сигнальном каскаде каждого конкретного случая.

**Ключевые слова:** сигнальный путь Wnt, меланома,  $\beta$ -катенин.

NUCLEAR  $\beta$ -CATENIN LOCALIZATION IS NOT SUFFICIENT FOR CANONICAL WNT SIGNALING ACTIVATION IN HUMAN MELANOMA CELL LINES, by K. V. Kulikova<sup>1\*</sup>, A. V. Posvyatenko<sup>1</sup>, N. V. Gnuchev<sup>1</sup>, G. P. Georgiev<sup>1</sup>, A. V. Kibardin<sup>1,2\*\*</sup>, S. S. Larin<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia, \*e-mail: kulikova@genebiology.ru; <sup>2</sup>University of Oslo, Center for Medical Studies, Moscow, 119334 Russia; \*\*e-mail: kibardin@igb.ac.ru). In most cases, advanced stages of melanoma are practically incurable due to high metastatic potential of tumor cells. Multiple observations support the idea that aberrations in Wnt signaling pathway play a significant role in melanoma development and progression. Canonical Wnt signaling activation results in stabilization and accumulation of the major effector molecule called  $\beta$ -catenin. Mutations promoting  $\beta$ -catenin stabilization and, thereby, activation of canonical Wnt signaling pathway are frequently found in different cancers, but rarely observed in melanomas. Nevertheless,  $\beta$ -catenin nuclear and cytoplasmic accumulation is the feature of many human melanoma cell lines and original tumors. That is why, the aim of the investigation was to elucidate the relation between  $\beta$ -catenin intracellular localization and activity status of Wnt signaling pathway in human melanoma cell lines. Ten human melanoma cell lines were characterized on the basis of the following parameters: canonical Wnt ligand expression, intracellular  $\beta$ -catenin localization, and activity status of canonical Wnt signaling pathway. Here, it has been demonstrated that nuclear localization of  $\beta$ -catenin does not always correspond to active status of canonical Wnt signaling pathway. Moreover, in the majority of cell lines with nuclear  $\beta$ -catenin canonical Wnt signaling can't be activated by exogenous expression of an appropriate ligand. Human melanoma cell lines differ in activity of

\* Эл. почта: kulikova@genebiology.ru

canonical Wnt signaling pathway as well as in mechanisms of its regulation. Therefore, the pathway-targeted potential antineoplastic therapy requires the formation of a “molecular pattern of cancer” for localization of the defect in Wnt signaling cascade in the each case.

**Keywords:** Wnt signaling pathway, melanoma,  $\beta$ -catenin.

Чрезмерное пребывание на солнце, термические и химические ожоги, наследственная предрасположенность — вот лишь немногие факторы, способствующие возникновению меланомы. По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), в 2008 году в мире зафиксировано около 200000 случаев меланомы кожи, и этот показатель постоянно растет [1]. Среднегодовой прирост заболеваемости в мире составляет около 5% (в США — 4%, в России — 3.9%), т.е. один из самых высоких среди всех злокачественных опухолей (второй после рака легкого) [2]. Эффективность существующих методов лечения меланомы напрямую зависит от стадии заболевания. К сожалению, несмотря на возможность визуальной локализации, меланому детектируют на начальных (I–II) стадиях лишь у 62–65% пациентов, в то время как в остальных случаях приходится иметь дело с запущенной формой заболевания [3]. В результате выживаемость больных меланомой низкая. Разработка способов противоопухолевой терапии на поздних стадиях заболевания требует детального понимания молекулярных процессов, лежащих в основе прогрессии меланом.

Меланома возникает вследствие злокачественного перерождения производных клеток нервного гребня — меланоцитов. Огромное количество данных свидетельствует о том, что в подобной трансформации ключевую роль играют нарушения в регуляции сигнальных каскадов, запускаемых лигандами семейства Wnt [4–6]. Интересно, что в норме процесс созревания, позиционирования и дифференцировки будущих меланоцитов сопровождается активацией различных компонентов сигнального каскада Wnt [7, 8]. Так, например, Wnt1 регулирует дифференцировку меланоцитов в эмбрионе мыши [9], а экспрессия Wnt11 необходима для миграции клеток нервного гребня в эмбрионе *Xenopus laevis* [10].

На настоящий момент признано существование трех различных ветвей сигнального пути Wnt [11]. Наиболее охарактеризован так называемый канонический сигнальный путь Wnt. В отличие от двух других этот сигнальный каскад связан со стабилизацией  $\beta$ -катенина. Связывание одного из Wnt-лигандов (Wnt1, Wnt3a, Wnt8) с соответствующим трансмембранным рецептором Fz (Frizzled) и корецептором из семейства LRP-5/6 приводит к активации цитоплазматического белка Dvl (Dishevelled). Активированный Dvl способствует стабилизации  $\beta$ -катенина за счет ингиби-

рования образования “комплекса деструкции”. В отсутствие внеклеточного лиганда цитоплазматический  $\beta$ -катенин взаимодействует со специальным “комплексом деструкции”, состоящим из каркасных белков APC (Adenomatous Polyposis Coli), Axin и киназ SKI (Casein Kinase I) и GSK-3 $\beta$  (Glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ). Находясь в составе этого комплекса,  $\beta$ -катенин подвергается GSK-3 $\beta$ -зависимому фосфорилированию, что служит сигналом для его дальнейшей протеасомной деградации по убиквитин-зависимому механизму. При активации канонического сигнального пути Wnt стабилизированный  $\beta$ -катенин накапливается в цитоплазме, после чего транслоцируется в ядро, где служит коактиватором транскрипции таких генов, как MYC [12], PTGS2 (циклооксигеназы 2) [13], MMP7 (матриксной металлопротеиназы 7) [14], CCND1 (циклина D1) [15] и других. Поскольку среди мишеней канонического Wnt-каскада содержится большое количество генов, контролирующих рост и развитие клеток, конститутивная активация этого сигнального пути часто ассоциирована с различными видами опухолей [16, 17]. Так, рак кишечника сопровождается мутациями в гене супрессора опухолей APC [18] и гене AXIN2 [19]; а для гепатоцеллюлярного рака характерны стабилизирующие мутации в гене  $\beta$ -катенина, CTNNB1 [20]. При меланоме мутации компонентов канонического сигнального каскада встречаются сравнительно редко, тем не менее, накопление  $\beta$ -катенина в ядре и цитоплазме неоднократно регистрировали при этом заболевании [5, 6, 21]. Обнаружена корреляция между ядерной локализацией  $\beta$ -катенина в опухолевых клетках меланомы и благоприятным прогнозом по выживаемости пациентов в долгосрочной перспективе. Предполагают, что это связано с активностью канонического сигнального пути [22].

Цель данной работы состояла в том, чтобы установить наличие взаимосвязи между ядерной локализацией  $\beta$ -катенина в клеточных линиях меланомы человека и статусом активности канонического сигнального пути Wnt в этих клеточных линиях.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Клеточные культуры.** Анализ статуса активности канонического сигнального пути Wnt проведен на клеточных линиях меланомы человека: MelR, MelG, MelME, MelKsen, MelKis, Mel226, Mellbr, MellL, MelP, MelSi, Mel82. Все клеточные

линии получены ранее в ходе совместной работы с Российским онкологическим центром им. Н.Н. Блохина и Научно-исследовательским институтом онкологии им. профессора Н.Н. Петрова [23–25]. Первичные культуры выделяли из метастатических узлов пациентов, страдающих меланомой. Все клеточные линии культивировали на среде RPMI-1640 (“HyClone”, США) с добавлением 10%-ной эмбриональной бычьей сыворотки (“HyClone”), 2 mM L-глутамин (“HyClone”, США), 100 ед./мл пенициллина (“ОАО Синтез”, Россия) и 100 мкг/мл стрептомицина (“ОАО Биохимик”, Россия) в условиях 7% CO<sub>2</sub>, 95% влажности и при температуре 37°C.

**Трансфекция, люциферазный тест и иммуноблоттинг.** Клеточные линии меланомы человека высевали в 24-луночные планшеты (для двойного люциферазного теста) и в 6-луночные (для иммуноблоттинга) из расчета  $(0.2–0.25) \times 10^6$  и  $0.5 \times 10^6$  клеток в лунку соответственно. Через 19–20 ч проводили трансфекцию клеток с использованием реагента Unifectin-56 (“Unifect Group”, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Для клеток, культивированных в 24-луночных планшетах, на каждую реакцию трансфекции брали по 0.5 мкл Unifectin-56, 100 нг TOPFLASH (“Millipore”, США), 2 нг pRL-CMV (“Promega”, США) и 100 нг pcDNA<sup>TM</sup>5/FRT/TO (“Invitrogen Corporation”, США). Для реакции трансфекции использовали 1 нг плазмидной ДНК pCMV-hWnt3a. Вектор pCMV-hWnt3a, кодирующий ген *Wnt3a* человека (№ NM\_033131 в NCBI GenBank), любезно предоставлен д.б.н. И.В. Коробко (Институт биологии гена РАН). Для клеток, выращенных в 6-луночных планшетах, на каждую реакцию трансфекции брали по 2 мкл Unifectin-56 и 500 нг соответствующей плазмидной ДНК. Трансфицированные клетки выращивали при температуре 37°C в течение 26 ч, после чего лизировали.

Люциферазную активность детектировали с помощью двойного люциферазного теста (“Promega”). БиOLUMИнесценцию измеряли на приборе Glomax 20/20 Luminometer (“Promega”). Каждый эксперимент проводили трижды и на основании полученных значений рассчитывали среднее арифметическое.

Подготовку проб для анализа методом иммуноблоттинга проводили следующим образом. Содержимое каждой лунки 6-луночного планшета лизировали в 100 мкл буфера для нанесения образцов на гель (125 mM Трис-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% глицерин, 10% β-меркаптоэтанол и бромфеноловый синий), лизат кипятили в течение 15 мин и затем центрифугировали. Полученные образцы подвергали электрофорезу в денатурирующих условиях в 10%-ном ПААГ [26]. Перенос белков на PVDF-мембрану (HYBOND-P, “GE Healthcare”, Великобритания) проводили при

90 мА в течение 1 ч. Мембрану блокировали 5%-ным раствором сухого обезжиренного молока в буфере PBS, pH 7.4 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) с 0.1% Tween-20 в течение 1 ч при комнатной температуре. Для детекции β-катенина использовали кроличьи антитела к β-катенину (“Cell Signaling Technology”, США) и антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (“GE Healthcare”); α-тубулин детектировали, используя мышиные моноклональные антитела анти-α-тубулин (“Sigma-Aldrich”, США) и антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (“GE Healthcare”). Меченые белки визуализировали с помощью набора реагентов Immobilon Western (“Millipore”).

**Выделение РНК и ОТ-ПЦР.** При выделении суммарной РНК из клеток линии меланомы человека использовали набор “RNeasy Mini Kit” (“Qiagen GmbH”, Германия), в реакции обратной транскрипции использовали ревертазу RevertAid Reverse Transcriptase (“Fermentas”, Литва). Синтезированная в ходе реакции обратной транскрипции первая цепь кДНК использована в качестве матрицы для ПЦР со следующими праймерами: 5'-ATGGCCCCACTCGGATACTT-3' и 5'-GAGC-CCAGGGAGGAATACTG-3' (PrimerBank ID 14916475a1) для hWnt3a; 5'-ACCACAGTCCATGC-CATCAC-3' и 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' для глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). Условия проведения ПЦР для амплификации участка hWnt3a: 95°C в течение 4 мин 30 с, после чего 35 циклов 95°C в течение 30 с, 61°C в течение 30 с и 72°C в течение 30 с. Условия проведения ПЦР для амплификации участка GAPDH: 95°C в течение 4 мин 30 с, после чего 19 циклов 95°C в течение 30 с, 60°C в течение 30 с и 72°C в течение 30 с. Все ПЦР-продукты анализировали в 5%-ном ПААГ.

**Фиксация и окрашивание клеток (иммуноцитохимия).** Внутриклеточную локализацию β-катенина определяли иммуноцитохимическим методом. Клетки меланомы человека выращивали на покровных стеклах в течение 19–20 ч, после чего проводили фиксацию в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 15 мин при 4°C и пермеабиллизацию охлажденным раствором 0.2%-ного Triton X-100 в PBS, pH 7.4. Способ фиксации для клеток MelG отличался от вышеописанного. Клетки MelG фиксировали в холодном метаноле в течение 10 мин, затем окрашивали, используя в качестве первичных кроличьи антитела к β-катенину (“Cell Signaling Technology”) и в качестве вторичных антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с Alexa Fluor® 488 (“Invitrogen Molecular Probes<sup>TM</sup>”, США). Ядра окрашивали DAPI (“Sigma-Aldrich”). Детекцию проводили на флуоресцентном микроскопе Leica DMR с камерой (“Leica Microsystems Wetzlar

GmbH”, Германия). Фотографии в формате JPEG обрабатывали в программе ImageJ, где вычисляли средний уровень яркости (Mean Gray Value) для области ядра (N) и клетки в целом (C). Измеряемая средняя яркость области ядра ( $I_{N+C}$ ) включает и среднюю яркость клетки ( $I_C$ ) – в силу особенностей флуоресцентной микроскопии (измеряется как яркость свечения ядра, так и яркость свечения мембраны/цитоплазмы клетки); поэтому собственную среднюю яркость области ядра ( $I_N$ ) рассчитывали как разность между измеряемой яркостью области ядра и средней яркостью клетки:  $I_N = (I_{N+C} - I_C)$ . Результаты вычислений представлены в виде значений величины  $I_N/I_C$ , т.е. как отношение содержания  $\beta$ -катенина в ядре к общему содержанию его внутри клетки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе исследовано 10 клеточных линий меланомы человека, полученных из биопсийного материала метастатических узлов больных, страдающих меланомой, на предмет связи функционального состояния канонического сигнального пути Wnt с внутриклеточной локализацией  $\beta$ -катенина.

### *Для большинства клеточных линий меланомы человека характерна внутриядерная локализация $\beta$ -катенина*

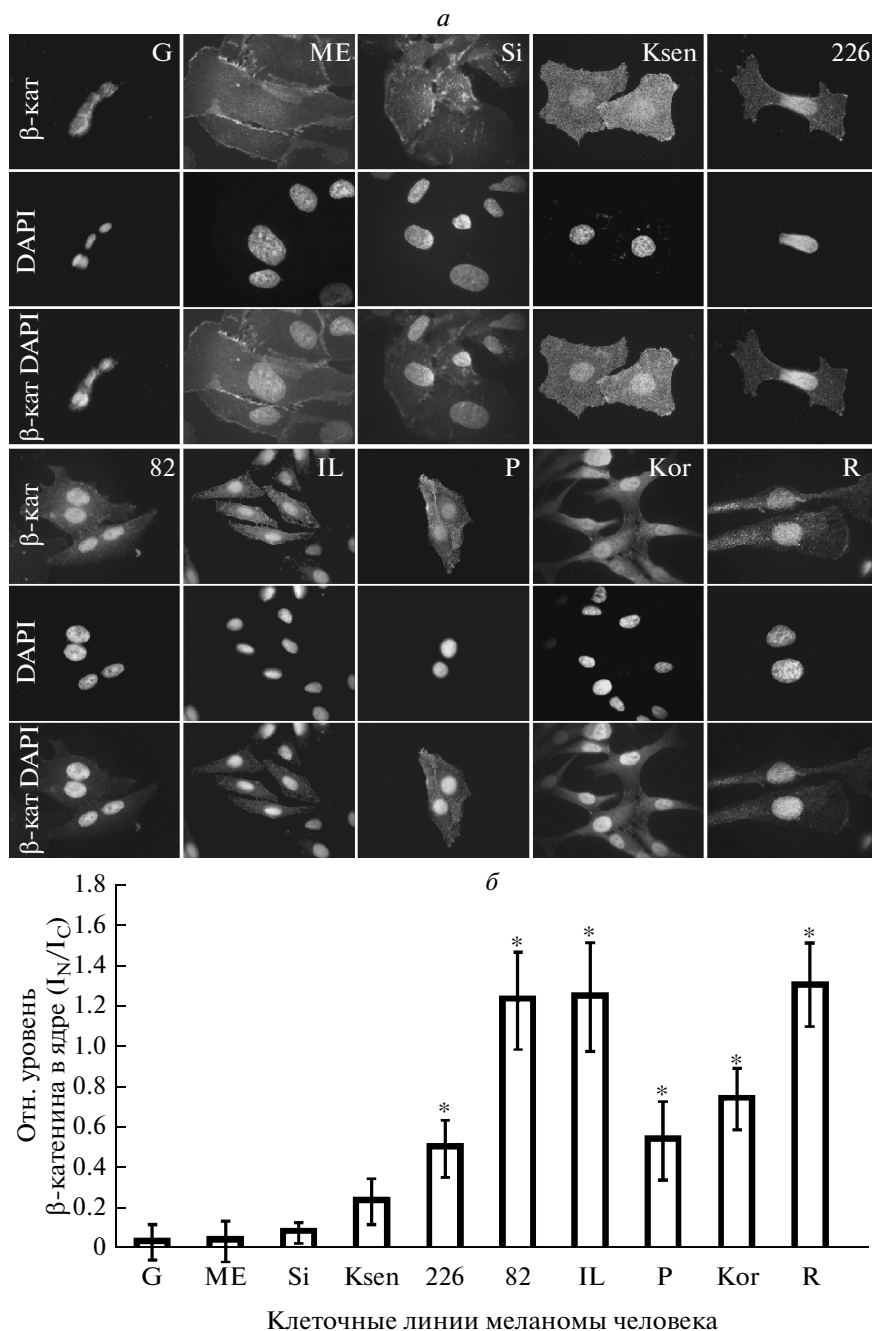
С целью установить внутриклеточную локализацию  $\beta$ -катенина в различных клеточных линиях меланомы человека проводили иммуноцитохимический анализ каждой из клеточных линий, после чего интенсивность окрашивания ядер и клеток оценивали с помощью программы ImageJ. Границы ядер определяли окрашиванием DAPI. Используемая методика позволила четко выделить границу между цитоплазматическим/мембранным и ядерным  $\beta$ -катенином. В большинстве исследованных клеточных линий (67%) достоверно показана локализация  $\beta$ -катенина в цитоплазме/на мембране и в ядре. При этом только в 3 клеточных линиях не зарегистрировано ядерной локализации  $\beta$ -катенина (рис. 1).

Известно, что  $\beta$ -катенин в клетке может выполнять несколько различных функций, которые напрямую связаны с его внутриклеточной локализацией. Находясь на внутренней поверхности мембраны в составе белкового комплекса, образующего адгезионные контакты,  $\beta$ -катенин участвует в поддержании клеточной архитектуры. Будучи транслоцированным в ядро,  $\beta$ -катенин выступает уже как коактиватор транскрипции TCF-зависимых генов [27]. Полученные данные позволяют условно разделить исследо-

ванные клеточные линии меланомы человека на две группы, основываясь на внутриклеточной локализации  $\beta$ -катенина. Следует отметить, что в большинстве исследованных клеточных линий не наблюдалось гетерогенности по распределению  $\beta$ -катенина. В пределах одной клеточной линии 95–98% клеток имели одинаковую локализацию  $\beta$ -катенина. Эти результаты свидетельствуют о различиях, которые существуют между клеточными линиями и реальными опухолями, так как по литературным данным для первичных опухолей меланомы характерна гетерогенность. Положительным фактором в данной ситуации можно считать то, что клеточные линии представляют собой аналоги различных субпопуляций клеток меланомы, а значит, на них можно детально изучать интересующие параметры, причем в конкретном, более однородном контексте. В соответствии с существующими представлениями наличие  $\beta$ -катенина в ядре клеточных линий должно сопровождаться активацией канонического сигнального пути Wnt [11].

### *В ряде клеточных линий меланомы человека зарегистрирован транскрипт лиганда Wnt3a*

Появление стабилизирующих мутаций  $\beta$ -катенина в меланомах человека – достаточно редкое событие. Гораздо чаще накопление  $\beta$ -катенина происходит за счет активации сигнального пути Wnt и разрушения дестабилизирующего  $\beta$ -катенин комплекса. Предполагают, что лиганд Wnt3a – один из основных “канонических” лигандов, экспрессирующихся в меланомах, который регулирует активность канонического сигнального пути Wnt и поэтому претендует на роль фактора, влияющего на ядерную локализацию  $\beta$ -катенина. С целью определить, насколько лиганд Wnt3a задействован в регуляции сигнального пути в исследуемых клеточных линиях, мы оценили в них уровень мРНК Wnt3a методом ОТ-ПЦР, нормировав все ПЦР-продукты по экспрессии гена “домашнего хозяйства” GAPDH. В ряде клеточных линий меланомы человека, действительно, обнаружен искомым транскрипт Wnt3a (рис. 2). В результате сравнительного анализа показано, что во всех линиях с экспрессией гена Wnt3a  $\beta$ -катенин локализуется в ядре. В тоже время в некоторых линиях с ядерной локализацией  $\beta$ -катенина не обнаружено экспрессии гена Wnt3a. Полученные данные свидетельствуют о том, что клеточные линии меланомы могут использовать различные механизмы регуляции активности сигнального каскада, в том числе экспрессируя различные лиганды сигнального пути.



**Рис. 1.** Локализация  $\beta$ -катенина в клеточных линиях меланомы человека: MelG (G), MelME (ME), MelSi (Si), MelKsen (Ksen), Mel226 (226), Mel82 (82), MelIL (IL), MelP (P), MelKor (Kor), MelR (R). *a* – Иммуноцитохимический анализ клеточных линий меланомы человека антителами к  $\beta$ -катенину; ядра клеток окрашены DAPI. *б* – Содержание  $\beta$ -катенина в ядре по отношению к общему содержанию  $\beta$ -катенина внутри клетки. По оси Y отложена величина  $I_N/I_C$ , отражающая уровень  $\beta$ -катенина в ядре по отношению к общему уровню внутри клетки.  $I_N$  – средняя яркость области ядра,  $I_C$  – средняя яркость всей клетки. Звездочками отмечены статистически значимые различия в распределении  $\beta$ -катенина (ядро/клетка), измеренные по отношению к MelG.

**При активации канонического сигнального пути в клеточной линии, чувствительной к лиганду *Wnt3a*, происходит накопление  $\beta$ -катенина в клетке**

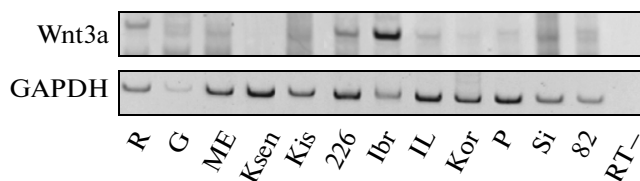
Цепь событий, связанная с активацией канонического сигнального пути, включает в себя раз-

рушение дестабилизирующего  $\beta$ -катенин комплекса, накопление  $\beta$ -катенина в цитоплазме, его транслокацию в ядро и, как следствие, стимуляцию транскрипционной активности факторов семейства TCF/LEF [11]. С целью проверки модельной системы по активации канонического

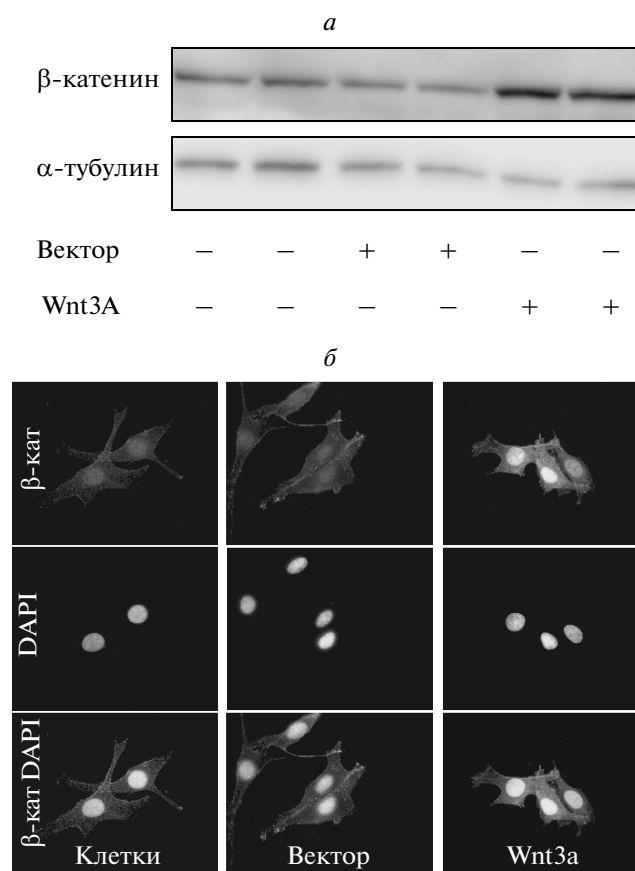
сигнального пути Wnt нами выбрана клеточная линия меланомы человека MelP — с достаточно низким содержанием  $\beta$ -катенина в ядре по отношению к общему количеству в клетке (рис. 1б) и не продуцирующая лиганд Wnt3a (рис. 2). Через 24 ч после трансфекции генетической конструкцией, позволяющей экспрессировать Wnt3a, в клетках методом иммуноблотинга проанализировали относительный уровень эндогенного  $\beta$ -катенина (рис. 3а). Полученные значения нормализовали по продукции  $\alpha$ -тубулина. Показано, что в результате трансфекции плазмидной ДНК, кодирующей Wnt3a, уровень  $\beta$ -катенина в клетках значительно вырос. Эти результаты подтверждены иммуноцитохимическим анализом (рис. 3б): интенсивность окрашивания клеток, трансфицированных конструкцией, кодирующей ген Wnt3a, антителами к  $\beta$ -катенину значительно превосходила интенсивность в контрольных клетках. Анализ интенсивности окрашивания внутриклеточного распределения  $\beta$ -катенина в исходной клеточной линии и в клетках, трансфицированных Wnt3a, показал, что, несмотря на увеличение общего количества  $\beta$ -катенина в трансфицированных клетках, соотношение между его содержанием в ядре и цитоплазме не изменяется. Таким образом, установлено, что гиперэкспрессия Wnt3a влияет исключительно на регуляцию стабильности  $\beta$ -катенина.

**Внутриклеточная локализация  $\beta$ -катенина не может считаться достаточным условием активности TCF/LEF-зависимого промотора в клеточных линиях меланомы человека**

В результате активации канонического сигнального пути Wnt регулируется транскрипционная активность факторов семейства TCF/LEF. Нами проведен сравнительный анализ способности клеточных линий меланом человека активировать TCF-зависимый промотор при воздействии лиганда Wnt3a с использованием двойной люциферазной репортерной системы (рис. 4). В клеточной линии MelP, в которой происходит накопление  $\beta$ -катенина в результате экспрессии Wnt3a (рис. 3), мы обнаружили значительное увеличение относительной активности TCF-зависимого промотора, что означает, что активность этого промотора регулируется лигандом Wnt3a посредством активации канонического сигнального пути. Таким же способом нами проанализированы другие клеточные линии меланомы человека. Обнаружено, что из восьми исследованных клеточных линий только в двух (MelP и MelG) активность TCF-зависимого промотора значительно усиливается в результате экспрессии Wnt3a, в то время как в шести других клеточных линиях активации этого промотора не происходит. При этом в двух из шести линий, не чувствительных к

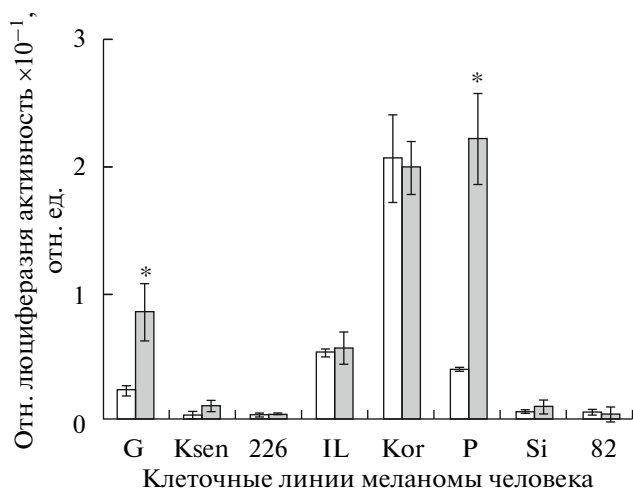


**Рис. 2.** Экспрессия гена *Wnt3a* в клеточных линиях меланомы человека. Методом ОТ-ПЦР проанализирована экспрессия *Wnt3a* в 12 клеточных линиях меланомы человека (те же, что и на рис. 1, а также Mel-Kis (Kis), MelIbr (Ibr)). GAPDH — глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа; RT(–) — отрицательный контроль (без обратной транскриптазы).



**Рис. 3.** Накопление  $\beta$ -катенина в клетках линии MelP вследствие активации канонического сигнального пути. Клеточную линию MelP трансфицировали генетической конструкцией, кодирующей лиганд Wnt3a (Wnt3a) или пустым вектором (pcDNA<sup>TM</sup>5/FRT/TO, США). а — Анализ содержания  $\beta$ -катенина в клеточной линии MelP методом иммуноблотинга; б — иммуноцитохимический анализ распределения  $\beta$ -катенина в клеточной линии MelP; ядра клеток окрашены DAPI.  $\beta$ -кат —  $\beta$ -катенин; клетки — не трансфицированные клетки.

Wnt3a, MelIL и MelKor, обнаружен высокий уровень активности TCF-зависимого промотора в отсутствие каких-либо дополнительных воздей-



**Рис. 4.** Активация TCF/LEF-зависимого промотора в клеточных линиях меланомы человека под воздействием лиганда Wnt3a. Все клеточные линии трансфицированы смесью плазмид TOP + Ren + FRT (белые столбики) или смесью плазмид TOP + Ren + FRT + Wnt3a (серые столбики), где TOP – плазмидная ДНК TOPFLASH, Ren – плазмидная ДНК pRL-CMV, FRT – плазмидная ДНК pcDNA<sup>TM</sup>5/FRT/TO, Wnt3a – плазмидная ДНК pCMV-hWnt3a. Звездочками отмечены статистически значимые различия по относительной люциферазной активности между клетками, трансфицированными смесью плазмид TOP + Ren + FRT и смесью плазмид TOP + Ren + FRT + Wnt3a.

ствий, что свидетельствует об активности канонического сигнального пути. В остальных четырех линиях (MelKsen, Mel226, MelSi и Mel82) уровень активности репортерной конструкции был крайне низким по сравнению с другими клеточными линиями; причем в двух из них (Mel226 и Mel82) ранее зарегистрирована ядерная локализация  $\beta$ -катенина (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о том, что в клеточных линиях меланомы человека существует огромное разнообразие молекулярных процессов, влияющих на активность канонического сигнального пути Wnt. Меланомы отличаются друг от друга как по активности сигнального каскада Wnt, так и по механизмам его регуляции. Спектр секретируемых лигандов, регулирующих сигнальный путь, также может варьировать. Способность лиганда Wnt3a активировать канонический сигнальный путь в одних клеточных линиях и неспособности делать это в других – нечувствительных к нему линиях – может быть связана с профилем экспрессии рецепторов сигнального пути. Кроме того, есть и очевидные различия во внутриклеточных механизмах активации сигнального пути, о чем свидетельствует наблюдаемое в ряде случаев отсутствие активности TCF-зависимого промотора при ярко выраженной ядерной локализации  $\beta$ -катенина.

Многочисленные данные свидетельствуют о существенном вкладе сигнального пути Wnt в раз-

витие меланомы. Однако при сравнительном анализе статуса активности этого сигнального пути в отдельных клеточных линиях выявлены значительные различия задействованных молекулярных механизмов. Очевидно, что для лучшего понимания процессов, влияющих на формирование опухолевого фенотипа меланомы, и разработки эффективных методов терапии необходимо разработать систему классификации опухолей на молекулярном уровне, что позволит в каждом конкретном случае, в зависимости от “молекулярного портрета опухоли”, подбирать соответствующую терапию.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (11-04-01863-а), Программой Президиума Российской академии наук “Молекулярная и клеточная биология” и грантом Центра медицинских исследований в Москве Института Осло.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ferlay J., Shin H.R., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin D.M. 2010. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet], Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Лемехов В.Г. 2001. Эпидемиология, факторы риска, скрининг меланомы кожи. *Практическая онкология*. **4**, 3–11.
3. Двойрин В.В., Трапезников Н.Н., Михайловский А.В. 1997. Статистика меланомы кожи в России. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*. **8**, 3–12.
4. Rubinfeld B., Robbins P., el-Gamil M., Albert I., Porfiri E., Polakis P. 1997. Stabilization of  $\beta$ -catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science*. **275**, 1790–1792.
5. Rimm D.L., Caca K., Hu G., Harrison F.B., Fearon E.R. 1999. Frequent nuclear/cytoplasmic localization of  $\beta$ -catenin without exon 3 mutations in malignant melanoma. *Am. J. Pathol.* **54**, 325–329.
6. Omholt K., Platz A., Ringborg U., Hansson J. 2001. Cytoplasmic and nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin is rarely caused by CTNNB1 exon 3 mutations in cutaneous malignant melanoma. *Int. J. Cancer*. **92**, 839–842.
7. Cadigan K.M., Nusse R. 1997. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* **11**, 3286–3305.
8. Зарайский А.Г. 2007. Нейральная индукция: новые достижения и перспективы. *Молекуляр. биология*. **41**, 200–215.
9. Dunn K.J., Williams B.O., Li Y., Pavan W.J. 2000. Neural crest-directed gene transfer demonstrates Wnt1 role in melanocyte expansion and differentiation during mouse development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 10050–10055.
10. De Calisto J., Araya C., Marchant L., Riaz C.F., Mayor R. 2005. Essential role of non-canonical Wnt signaling in neural crest migration. *Development*. **132**, 2587–2597.

11. Weeraratna A.T. 2005. A Wnt-er Wonderland – the complexity of Wnt signaling in melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* **24**, 237–250.
12. He T.C., Sparks A.B., Rago C., Hermeking H., Zawel L., da Costa L.T., Morin P.J., Vogelstein B., Kinzler K.W. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* **281**, 1509–1512.
13. Howe L.R., Subbaramaiah K., Chung W.J., Dannenberg A.J., Brown A.M. 1999. Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in Wnt-1-transformed mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res.* **59**, 1572–1577.
14. Brabletz T., Jung A., Dag S., Hlubek F., Kirchner T. 1999.  $\beta$ -catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am. J. Pathol.* **155**, 1033–1038.
15. Stutman M., Zhurinsky J., Simcha I., Albanese C., D'Amico M., Pestell R., Ben-Ze'ev A. 1999. The cyclin D1 gene is a target of the  $\beta$ -catenin/LEF1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 5522–5527.
16. Адлер В.В., Полоцкая А.В., Герштейн Е.С., Красильников М.А. 2003. Сигнальные пути, контролирующие рост и выживаемость клеток рака предстательной железы в отсутствие андрогенов. *Молекуляр. биология.* **37**, 688–695.
17. Пономарева А.А., Рыкова Е. Ю., Чердынцева Н.В., Чойнзонов Е.Л., Лактионов П.П., Власов В.В. 2011. Молекулярно-генетические маркеры в диагностике рака легкого. *Молекуляр. биология.* **45**, 203–217.
18. Tominaga O., Nita M.E., Nagawa H., Muto T. 1998. Screening for APC mutations based on detection of truncated APC proteins. *Dig. Dis. Sci.* **43**, 306–310.
19. Liu W., Dong X., Mai M., Seelan R.S., Taniguchi K., Krishnadath K.K., Halling K.C., Cunningham J.M., Boardman L.A., Qian C., Christensen E., Schmidt S.S., Roche P.C., Smith D.I., Thibodeau S.N. 2000. Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating  $\beta$ -catenin/TCF signaling. *Nat. Genet.* **26**, 146–147.
20. de La Coste A., Romagnolo B., Billuart P., Renard C.A., Buendia M.A., Soubrane O., Fabre M., Chelly J., Beldjord C., Kahn A., Perret C. 1998. Somatic mutations of the  $\beta$ -catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 8847–8851.
21. Demunter A., Libbrecht L., Degreef H., de Wolf-Peeters C., van den Oord J.J. 2002. Loss of membranous expression of  $\beta$ -catenin is associated with tumor progression in cutaneous melanoma and rarely caused by exon 3 mutations. *Mod. Pathol.* **15**, 454–461.
22. Chien A.J., Moore E.C., Lonsdorf A.S., Kulikauskas R.M., Rothberg B.G., Berger A.J., Major M.B., Hwang S.T., Rimm D.L., Moon R.T. 2009. Activated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 1193–1198.
23. Mikhaylova I.N., Kovalevsky D.A., Morozova L.F., Golubeva V.A., Cheremushkin E.A., Lukashina M.I., Voronina E.S., Burova O.S., Utyashev I.A., Kiselev S.L., Demidov L.V., Beabealashvili R.Sh., Baryshnikov A.Y. 2008. Cancer/testis genes expression in human melanoma cell lines. *Melanoma Res.* **18**, 303–313.
24. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю., Морозова Л.Ф., Бурова О.С., Панкина Т.Н., Козлов А.М., Голубева В.А., Черемушкин Е.А., Дорошенко М.Б., Демидов Л.В., Киселев С.Л., Ларин С.С., Георгиев Г.П. 2005. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин. *Вестник РАМН.* **7**, 37–40.
25. Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Бурова О.С., Голубева В.А., Морозова Л.Ф., Воронина Е.С., Утяшев И.А., Аллахвердян Г.С., Субраманиан С., Кондратьева Т.Т., Черемушкин Е.А., Киселев С.Л., Демидов Л.В., Барышников А.Ю., Бибилашвили Р.Ш. 2010. Экспрессия раково-тестикулярных антигенов в клетках меланомы человека. *Сибирский онкологический журнал.* **1**, 29–39.
26. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680–685.
27. Gottardi C.J., Wong E., Gumbiner B.M. 2001. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting  $\beta$ -catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J. Cell Biol.* **153**, 1049–1059.