

УДК 577.21

## ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НОВОЙ ИЗОФОРМЫ ЛИГАНДА WNT11, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙСЯ В КЛЕТКАХ ЛИНИИ КАРЦИНОМЫ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА HT29

© 2012 г. А. В. Посвятенко<sup>1\*</sup>, К. В. Куликова<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>Центр медицинских исследований Университета Осло, Москва, 119334

Поступила в редакцию 26.05.2011 г.

Принята к печати 05.07.2011 г.

Карцинома кишечника — распространенное онкологическое заболевание, механизмы возникновения и развития которого активно изучаются уже несколько десятилетий. Как показано ранее, в клетках карциномы кишечника происходит aberrантная активация канонического сигнального пути Wnt. В литературе описана экспрессия лигандов, активирующих неканонические сигнальные пути в клетках этой опухоли. Не ясно, однако, какое значение в канцерогенезе и прогрессии карциномы кишечника играют неканонические пути Wnt. В данной работе исследована экспрессия “неканонического” лиганда hWnt11 в клетках линии карциномы кишечника человека HT29 с целью выявить особенности активации неканонического сигнального пути Wnt. Впервые показано, что экспрессия лиганда hWnt11 сопровождается альтернативным сплайсингом. Обнаруженная изоформа, hWnt11sp3, не секретируется и лишена способности ингибировать активацию канонического сигнального пути Wnt — характерного свойства полноразмерного лиганда hWnt11. Различные функциональные свойства лиганда hWnt11 и его сплайс-варианта hWnt11sp3 в опухолевых клетках могут отражать особое значение альтернативного сплайсинга в ходе канцерогенеза, так как aberrантная активность канонического сигнального пути Wnt характерна для многих типов опухолевых клеток. Таким образом, при исследовании роли лигандов Wnt следует учитывать возможность существования их изоформ, которые могут значительно различаться по функциональным характеристикам.

**Ключевые слова:** сигнальный путь Wnt, альтернативный сплайсинг hWnt11, линия клеток карциномы кишечника, двойной люциферазный тест.

FUNCTIONAL PROPERTIES OF THE WNT11 NEW ISOFORM, EXPRESSED IN COLON CARCINOMA CELL LINE HT29, by A. V. Posvyatenko<sup>1\*</sup>, K. V. Kulikova<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: posvyatenko@genebiology.ru; <sup>2</sup>University of Oslo, Center for Medical Studies, Moscow, 119334 Russia). Colon carcinoma is a common type of neoplastic transformation. Mechanisms of its establishment and progression have been studying for several decades. Aberrant activation of the canonical Wnt signaling is frequently observed in colon carcinoma cells. Moreover, expression of the “noncanonical” Wnt ligands is also detected in this type of cancer. However, the implication of the noncanonical Wnt signaling in carcinogenesis and colorectal cancer (CRC) progression is still unclear. Here, to elucidate the characteristic features of the noncanonical Wnt signaling activation in CRC the expression of the “noncanonical” ligand hWnt11 has been studied. It was shown for the first time that expression of the hWnt11 in CRC is accompanied by the alternative splicing. The new hWnt11 isoform (hWnt11sp3) has been identified. Unlike to hWnt11, this isoform is not secreted and lacks the ability to inhibit the canonical Wnt signaling. Considering the canonical Wnt signaling inhibiting activity of hWnt11, different functional properties of the ligand and its isoform may reflect a special role of the alternative splicing in carcinogenesis and tumor progression. Thus, due to the difference in their functional properties an existence of several Wnt isoforms should be taken into account for the investigation of the role of Wnt ligands.

**Keywords:** Wnt signaling pathways, hWnt11 alternative splicing, expression ligand hWnt11 isoforms in cancer cells, colon cancer cell line, dual-luciferase reporter assay.

\* Эл. почта: posvyatenko@genebiology.ru

Сигнальный путь Wnt — сигнальный каскад, играющий важную роль как в раннем эмбриональном развитии, так и в канцерогенезе [1, 2]. В современной литературе принято разделять сигнальный каскад Wnt на канонический и неканонический пути передачи сигнала. К каноническому относят сигнальный путь, регулирующий активность транскрипционных факторов семейства TCF/LEF (T-клеточный транскрипционный фактор/лимфоцитарный транскрипционный фактор). Ключевая молекула канонического сигнального пути Wnt — бета-катенин [3, 4]. В отсутствие активирующего сигнала бета-катенин связывается с дестабилизирующим комплексом белков, состоящим из APC (adenomatous polyposis coli), Axin, GSK3b (glycogen synthase kinase 3 beta) и CK1a (casein kinase 1 alpha), подвергается фосфорилированию и последующей протеасомной деградации. Активация канонического сигнального пути происходит при связывании лигандов семейства Wnt с трансмембранными рецепторами Fzd (Frizzled) и корецепторами LRP5/6, что приводит к разрушению дестабилизирующего комплекса. В результате происходит накопление бета-катенина и его транслокация в клеточное ядро, где он может регулировать транскрипционную активность факторов семейства TCF/LEF [5].

Молекулярные механизмы, в которых задействованы компоненты сигнального пути Wnt, также могут оказывать влияние на реорганизацию цитоскелета, клеточную подвижность и поляризацию клеток независимо от транскрипционной активности факторов семейства TCF/LEF. Такие процессы относят к неканоническому сигнальному пути Wnt. Считается, что неканонический сигнальный путь вызывает активацию малых GTPаз Ras и Rho, кроме того описана возможность его влияния на уровень внутриклеточного кальция [6, 7].

Длительное время считалось, что неканонический сигнальный путь активируется отдельной подгруппой “неканонических” Wnt-лигандов, наиболее изучены из которых Wnt5a и Wnt11. Однако в последнее время преобладает мнение, что активация того или иного сигнального пути Wnt предопределяется сочетанием всех экспрессируемых клеткой белков (лигандов, рецепторов и корецепторов, регуляторных и эффекторных молекул), а не только ограниченным кругом лигандов Wnt и рецепторов Fzd [8, 9]. Из корецепторов семейства Fzd наиболее изучен LRP5/6, но в активации неканонического сигнального пути функции корецептора могут выполнять атипичные тирозинкиназы Ryk и Ror1/2 [10–12]. Репертуар экспрессируемых клеткой рецепторов определяет выбор между каноническим и неканоническим путем передачи сигнала, причем не исключена такая их комбинация, при которой “неканонический” лиганд может активировать канонический

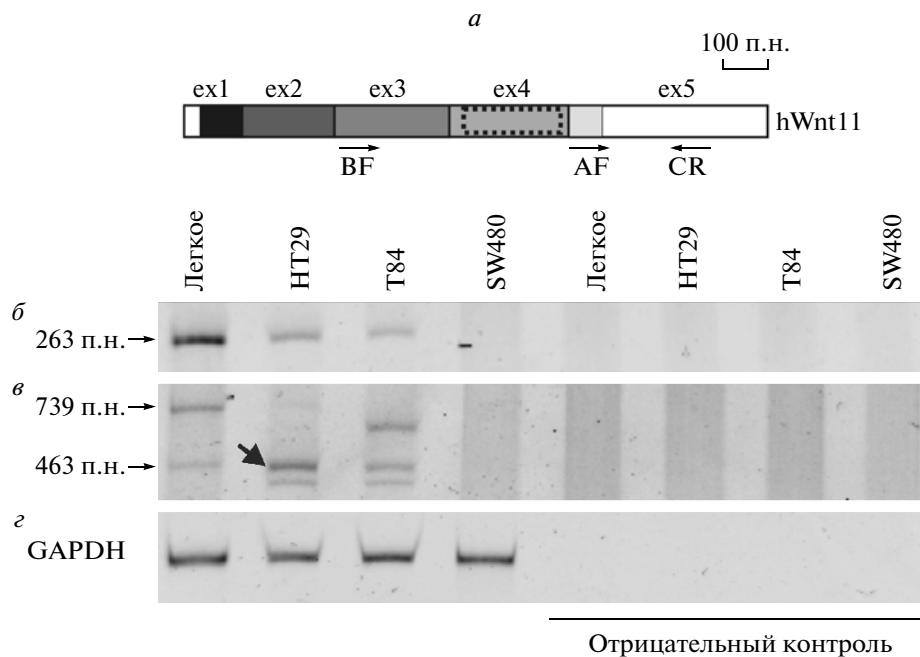
сигнальный путь [13]. Активация неканонического пути может сопровождаться ингибированием канонического сигнального пути Wnt. Ранее нами выявлен один из механизмов, обеспечивающих активацию неканонического и одновременное подавление канонического сигнального пути Wnt за счет активности протеинкиназы MAK-V, которая задействована в процессе метастазирования [14, 15]. Кроме того, ингибирование канонического сигнального пути Wnt при экспрессии “неканонических” лигандов может происходить благодаря конкуренции лигандов за рецепторы [16].

Наличие транскриптов “неканонических” лигандов Wnt показано в различных типах опухолевых клеточных линий [17]. Роль “неканонических” лигандов сигнального пути Wnt в развитии опухолевых заболеваний лучше всего изучена для меланомы. В этом случае экспрессия “неканонического” лиганда Wnt5a ассоциирована с высокоагрессивным опухолевым фенотипом [18–20], проявление которого может являться, в том числе, и следствием функциональной активности лиганда Wnt5a [21]. В большинстве случаев рака кишечника детектируются генетические изменения, затрагивающие сигнальный путь Wnt и приводящие к неконтролируемой активации канонического сигнального пути Wnt [22, 23]. Данные об экспрессии “неканонических” лигандов в клеточных линиях карциномы кишечника можно рассматривать как косвенный признак активации неканонического сигнального пути [24]. Однако многие авторы в своих исследованиях приходят к концепции контекст-зависимой регуляции активности сигнальных путей Wnt, в соответствии с которой для активации сигнальных путей существенно сочетание экспрессируемых клеткой белков.

Wnt11 — лиганд, способный активировать неканонический сигнальный путь Wnt и ингибировать активность канонического сигнального пути в раннем эмбриональном развитии. Цель данной работы — исследование особенностей экспрессии лиганда hWnt11 в клетках линии карциномы кишечника HT29 и функциональных характеристик изоформ этого лиганда. Обнаружено, что функциональная активность лиганда в клетках линии HT29 может существенно изменяться в результате альтернативного сплайсинга. Обнаруженная нами новая изоформа hWnt11sp3, экспрессирующаяся в клетках линии HT29, в отличие от hWnt11, не секретируется и не ингибирует канонический сигнальный путь Wnt.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Культивирование эукариотических клеток, трансфекция.** В работе использованы клеточные линии HT29, T84, CHO из Американской коллекции культур клеток (American Type Culture Collec-



**Рис. 1.** Исследование экспрессии *hWnt11* методом ОТ-ПЦР с применением двух пар праймеров. *a* – Схема структуры кДНК *hWnt11* с указанием положения праймеров AF, BF и CR (ex – номера экзонов). *б, в* – Экспрессия *hWnt11* в клетках линий карцином кишечника (HT29, T84, SW480) и в нормальной ткани легкого человека. Экспрессия *hWnt11* проанализирована методом ОТ-ПЦР с применением двух пар праймеров, сконструированных к различным участкам кДНК *hWnt11* таким образом, что больший участок BF-CR (*в*) содержит меньший AF-CR (*б*). Стрелкой на рисунке отмечен ампликон, исследованный в работе (463 п.н.). *г* – Положительный контроль – результаты ОТ-ПЦР, проведенной с применением праймеров к гену фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). Отрицательный контроль – без добавления обратной транскриптазы (для *б, в* и *г*).

tion, США) и Mel P [25, 26]. При культивировании клеточных линий HT29, T84 и CHO использовали среду DMEM/F12, для SW480 – среду L-15, а для Mel P – среду RPMI-1640. Указанные среды применяли с добавлением 10%-ной эмбриональной бычьей сыворотки, 2 mM L-глутамина, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Все реагенты производства “HyClone” (США).

Трансфекцию клеток проводили с использованием реагента Unifectin 56, любезно предоставленного к.х.н. Суровым А.Ю. (Институт биоорганической химии им. Шенякина и Овчинникова РАН, Москва), который применяли в соответствии с рекомендациями разработчика.

**Обратная транскрипция, полимеразная цепная реакция, секвенирование.** РНК выделяли из клеток карциномы кишечника или нормальной ткани легкого человека по стандартному протоколу [27]. Полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) проводили по стандартному протоколу [27] с использованием двух сочетаний праймеров AF+CR и BF+CR: AF [5'-GTG AAG GAC TCG GAA CTC GT-3'], BF [5'-GGG AGT CGG CCT TCG TGT AT-3'] и общий 3'-праймер CR [5'-TCA CTT GCA GAC ATA GCG CT-3']. Использование праймеров AF+CR

предполагает амплификацию участка, соответствующего фрагменту последовательности кДНК *hWnt11* от 848 до 1181 н., пары BF+CR – от 372 до 1181 н. (рис. 1a). Последовательность мРНК *Wnt11* человека (№ BC113386 из NCBI GenBank) использовали в качестве базовой для дизайна праймеров и анализа полученных в работе фрагментов ДНК.

Фрагмент, белковый продукт экспрессии которого использовали для получения антител, амплифицировали с помощью праймеров hvF1 [5'-AAG GAT CCC AGG ATG TGG CTG CTG AC-3'] и hvR1 [5'-AAG TCG ACT TAG GGG TTG TAG CCA CGC C-3']. Продукты ПЦР детектировали электрофорезом в 1%-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий, из которого амплифицированные фрагменты вырезали и очищали с помощью набора Genomed (“GENOMED GmbH”, Германия).

Секвенирование амплифицированных фрагментов проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 (“Applied Biosystems”, США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 (“Applied Biosystems”).

**Молекулярное клонирование.** Для создания экспрессионных конструкций в работе использо-

ваны плазмиды pсDNA5/FRT/ТО (“Invitrogen Corp.”, США), pGEX-4T-1 (“GE Healthcare”, США) и pQE-30 (“QIAGEN”, Германия). Молекулярное клонирование осуществляли с применением эндонуклеаз рестрикции и фермента ДНК-лигаза Т4 (“Fermentas”, Литва) по стандартной методике лигирования липких концов [27].

**Получение антител против hWnt11.** В качестве антигена для наработки антител против белка hWnt11 нами выбран участок Gln231-Pro320. Для экспрессии участка белка, выбранного для иммунизации, бактерии *E. coli* штамма XL10GOLD трансформированы конструкцией, полученной на базе вектора pGEX-4T-1 после встраивания последовательности ДНК, кодирующей фрагмент белка hWnt11 Gln231-Pro320. Трансформированные бактерии растили на среде LB и индуцировали экспрессию белка по стандартному протоколу [27].

Рекомбинантный белок, представляющий собой фрагмент Gln231-Pro320 лиганда hWnt11, слитый с ферментом глутатион-S-трансферазой, выделяли из лизатов бактерий и очищали с использованием глутатион-сефарозы: Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (“GE Healthcare”, Великобритания) – в соответствии с рекомендациями производителя. Иммунизацию кроликов, реиммунизацию с применением адьюванта Фрейнда (“Gibco”, США) и забор сыворотки проводили по стандартной методике [28].

Для аффинной очистки антител из поликлональной сыворотки получали химерный белок, представляющий собой фрагмент лиганда hWnt11 Gln231-Pro320, с последовательностью из шести гистидиновых остатков на N-конце (His<sub>6</sub> – “гистидиновый тэг”). Бактерии *E. coli* штамма XL10GOLD, трансформированные конструкцией на базе плазмиды pQE30, лизировали в соответствии с протоколом для денатурирующих условий. Нарботанный белок очищали методом металл-хелатной хроматографии, используя субстрат Ni-NTA (“QIAGEN”) в соответствии с протоколом производителя. Очищенный белок подвергали диализу против буфера (10 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 М мочевины, pH 8) и иммобилизовали на агарозе, активированной триазином. Полученный сорбент последовательно инкубировали с лизатом нетрансформированных бактерий, диализованным против того же буфера, а затем с сывороткой. Антитела, специфически связавшиеся с фрагментом лиганда hWnt11, элюировали с сорбента (0.1 М цитрата, 0.05% Tween, pH 2) и доводили значение pH до 7. После добавления этиленгликоля (до 40% об./об.) антитела хранили при температуре –20°C.

**Двойной люциферазный тест.** Для проведения двойного люциферазного теста клетки Mel P высевали в 24-луночный планшет, в количестве

$1.5 \times 10^5$  клеток на лунку. Через 18–20 ч клетки трансфицировали, используя плазмиду TOPFLASH (“Millipore”, США), плазмиду pRL-CMV (“Promega”), вектор pCMV-hWnt3a, кодирующий ген *Wnt3a* человека (№ NM\_033131 в NCBI GenBank), любезно предоставленный д.б.н. Коробко И.В. (Институт биологии гена РАН), и конструкции, полученные для экспрессии исследуемых изоформ белка. Через 72 ч после трансфекции клетки лизировали и детектировали интенсивность биолюминесценции в клетках, используя набор реактивов Dual-Luciferase Reporter Assay System (“Promega”) и люцинометр Glomax 20/20 Luminoimeter (“Promega”) в соответствии с рекомендациями производителя.

**Хроматография на гепарин-сефарозе.** Хроматографию на гепарин-сефарозе использовали для концентрирования образцов, причем проводили ее в малых объемах – инкубация без элюции. Гепарин-сефарозу CL-6B (“GE Healthcare”) уравновешивали фосфатно-солевым буфером с низким содержанием соли (до 20 мМ NaCl). Использовали клетки линии CHO, трансфицированные экспрессионными конструкциями на базе плазмиды pсDNA5/FRT/ТО или интактные клетки линии HT29. Через 72 ч после трансфекции клеток собирали кондиционную среду или лизировали клетки, используя фосфатный буфер с добавлением детергентов: 1% Triton X-100 (“Sigma”), 0.1% Nonidet-40 (“Flucka”, Швейцария). Аликвоту среды или лизата объемом 1 мл центрифугировали 1 мин со скоростью 14000 об/мин, супернатант инкубировали с 20 мкл 50%-ной гепарин-сефарозы при 4°C и постоянном перемешивании в течение ночи. Хроматографию проводили в соответствии с протоколом производителя; вместо элюции субстрат кипятили с равным объемом буфера Лэммли для последующей детекции белков, связавшихся с субстратом [29].

**Гель-электрофорез в ПААГ и Вестерн-блот анализ.** Электрофорез в 12.5%-ном ДДС-ПААГ проводили согласно стандартной методике [29]. После переноса белков на PVDF-мембрану HYBOND-P (“GE Healthcare”) блокировали неспецифическое связывание, инкубируя мембрану в течение часа с блокирующим буфером, содержащим 3%-ное обезжиренное молоко. После этого мембрану инкубировали с первичными антителами кролика против белка hWnt11, а затем со вторичными антителами против иммуноглобулинов кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (“GE Healthcare”). Люминесценцию детектировали с помощью набора реагентов Immobilon Western (“Millipore”).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *В клеточных линиях карциномы кишечника человека обнаружена экспрессия сплайс-вариантов лиганда Wnt11*

Сузуки (Suzuki) и соавторы [24], используя метод ОТ-ПЦР, обнаружили экспрессию различных лигандов семейства Wnt в ряде клеточных линий карциномы кишечника. В некоторых линиях присутствовали транскрипты почти всех обнаруженных лигандов. Возможно, наличие такого большого разнообразия транскриптов лигандов семейства Wnt есть следствие либо злокачественной трансформации клеток, либо того, что не все транскрипты лигандов транслируются в функциональные белки.

С целью исследовать особенности экспрессии “неканонического” лиганда hWnt11 в клеточных линиях карциномы кишечника человека HT29, T84 и SW480 мы использовали метод ОТ-ПЦР с двумя сочетаниями праймеров (рис. 1).

Расчетная величина последовательности, амплифицируемой при использовании пары праймеров AF+CR, составляет 263 п.н., а при использовании пары BF+CR – 739 п.н. Амплифицируемые фрагменты расположены относительно праймера CR таким образом, что меньший входит в состав большего.

В качестве контроля использована кДНК из нормальной ткани легкого человека. Обнаружено, что при использовании пары праймеров AF+CR, соответствующих 3'-области кДНК hWnt11, в ткани легкого человека и в клеточных линиях HT29 и T84 детектируется ПЦР-продукт, размер которого соответствует расчетной величине – 263 п.н. (рис. 1б). Полученные результаты позволяют сделать вывод об экспрессии мРНК лиганда в данных клеточных линиях.

В то же время при использовании пары праймеров BF+CR обнаружены ПЦР-фрагменты различного размера (рис. 1в). Продукты ПЦР с использованием кДНК из ткани нормального легкого человека представлены двумя ампликонами. Размер большего ампликона соответствует расчетной величине фрагмента, который должен амплифицироваться с последовательности, кодирующей hWnt11 (739 п.н.). Специфичность амплификации подтверждена секвенированием очищенного фрагмента.

Ампликоны меньшей величины, чем полноразмерный hWnt11, присутствовали в качестве продуктов ПЦР с кДНК из нормального легкого человека, клеток линий HT29 и T84.

В клетках линий карциномы кишечника при этом не зарегистрирован ампликон, соответствующий по размеру расчетной полноразмерной последовательности. Для исследования особенностей экспрессии лиганда hWnt11 в клетках линии

карциномы кишечника нами выбран ПЦР-фрагмент размером 463 п.н. – превалирующий продукт по результатам электрофоретического анализа.

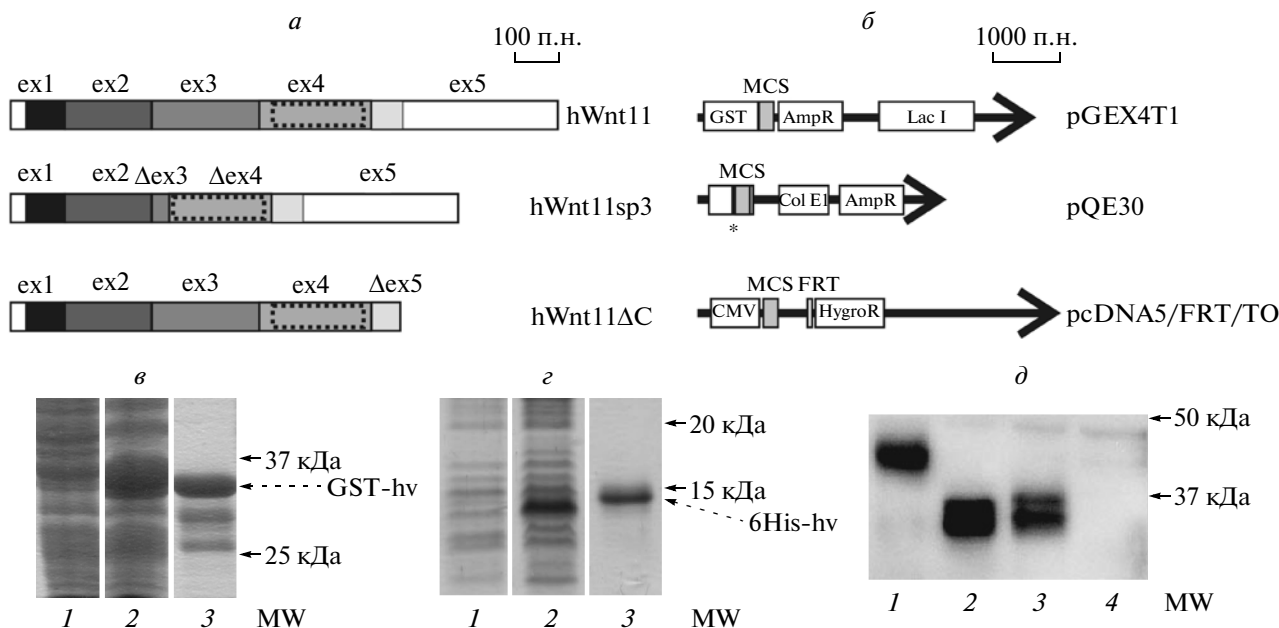
В результате секвенирования выбранного фрагмента установлено, что его нуклеотидная последовательность в целом идентична кДНК hWnt11, хотя несет делецию размером в 276 п.н., которая соответствует части последовательности третьего и четвертого экзонов гена *hWnt11*. *In silico* анализ показывает, что делеция не приводит к сдвигу рамки считывания. Нуклеотидная последовательность выбранного для исследования фрагмента депонирована в NCBI GenBank (№ JF800675) в качестве сплайс-варианта hWnt11sp3. Размер предполагаемого альтернативного белкового продукта соответствует 262 аминокислотным остаткам (354 для полноразмерного Wnt11) и имеет предполагаемую молекулярную массу 29.5 кДа (39 кДа для полноразмерного Wnt11).

### *Создание генно-инженерных конструкций и получение антител, необходимых для проведения исследования*

Чтобы исследовать свойства белкового продукта сплайс-варианта hWnt11sp3, необходимо было добиться его эффективной экспрессии в эукариотических клетках и разработать способ его детекции в клеточном лизате.

Для экспрессии белкового продукта hWnt11sp3 нами создана экспрессионная конструкция на базе плазмиды pсDNA5/FRT/ТО и последовательности, кодирующей сплайс-вариант. Для сравнительного анализа свойств исследуемого сплайс-варианта использовали конструкции на основе той же плазмиды, содержащие последовательности, кодирующие полноразмерный лиганд и фрагмент hWnt11, не содержащий С-концевой участка после Cys283 (hWnt11ΔC). 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 [30]. Ранее методом ОТ-ПЦР получили полноразмерный вариант кДНК hWnt11, который использовали для амплификации участка последовательности, кодирующей hWnt11ΔC. ПЦР-продукты очищали, секвенировали и клонировали в плазмиду pсDNA5/FRT/ТО (рис. 2а,б).

Обычно исследование функций и паттерна экспрессии нового белка проводят с использованием специфических антител; в данном случае нужны были антитела, специфически распознающие hWnt11. Нуклеотидную последовательность, кодирующую участок лиганда, выбранный для иммунизации (Gln231-Pro320), клонировали в плазмиду pGEX-4T-1 и pQE-30 для экспрессии в бак-



**Рис. 2.** Создание генно-инженерных конструкций для экспрессии в бактериальной и эукариотической системе. *a* – Схема экзонной структуры последовательностей, кодирующих полноразмерный лиганд hWnt11, изоформу hWnt11sp3 и доминантно-негативный вариант hWnt11ΔC. Обведенная пунктиром область соответствует последовательности, кодирующей участок белка Gln231-Pro320, выбранный для получения антител. *б* – Схема основных элементов плазмид, использованных в работе. Плазмиды pGEX4T1 и pQE30 использованы для экспрессии иммуногенного фрагмента в бактериальной экспрессионной системе. Плазмида pcDNA5/FRT/TO использована для экспрессии исследуемых форм лиганда hWnt11 в эукариотических клетках. Серым выделен полилинкерный участок (MCS), звездочка соответствует последовательности, кодирующей 6 гистидиновых остатков. *в, г* – Электрофорез в ДСН-ПААГ продуктов экспрессии иммуногенного фрагмента лиганда Wnt11 в бактериальной системе. Порядок нанесения: 1 – лизат неиндуцированных бактерий; 2 – лизат бактерий, индуцированных ИПТГ; 3 – очищенный белок. Бактерии трансформированы плазмидами pGEX4T1-hv (*в*) и pQE30-hv (*г*). *д* – Анализ функциональности экспрессионных конструкций, созданных на базе pcDNA5/FRT/TO, и последовательностей, кодирующих hWnt11 (1), hWnt11sp3 (2) и hWnt11ΔC (3), методом иммуноблотинга. В качестве отрицательного контроля использован лизат нетрансфицированных клеток (4).

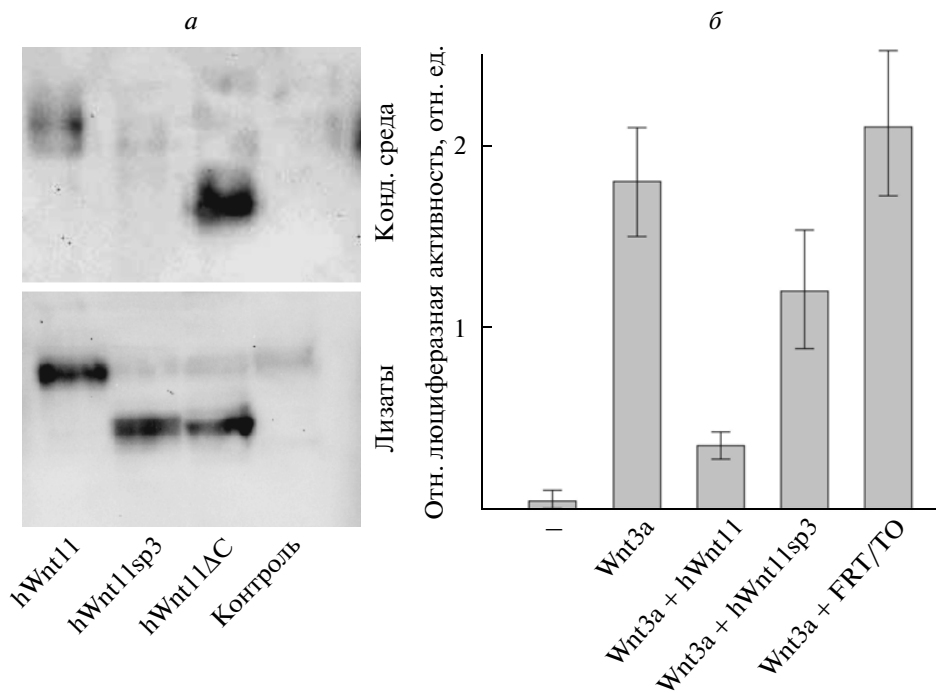
териальной системе. Нарботанные химерные белки использовали для получения антител: белок, слитый с глутатион-S-трансферазой (GST), – для иммунизации кроликов; а белок, несущий 6-гистидиновый тэг (His<sub>6</sub>), – для аффинной очистки антител из сыворотки (рис. 2*в,г*).

Проверку функциональности полученных экспрессионных генетических конструкций на базе pcDNA5/FRT/TO проводили по следующей схеме: клетки линии CHO были транзитивно трансфицированы, и наличие рекомбинантных белков подтверждали методом Вестерн-блот анализа (рис. 2*д*). В клеточных лизатах транзитивно трансфицированных клеток линии CHO зарегистрированы иммунореактивные полосы с молекулярными массами, соответствующими расчетным. На основании данных Вестерн-блот-анализа мы сделали вывод, что в результате трансфекции в клетках экспрессируются hWnt11, hWnt11sp3 и hWnt11ΔC, и все эти формы hWnt11 распознаются полученными антителами.

### **Белковый продукт сплайс-варианта hWnt11sp3 не обладает способностью секретироваться**

Лиганды семейства Wnt – секретлируемые белки, действующие на клетки, которые их экспрессируют, и на соседние с ними 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 [31].

Способность белкового продукта сплайс-варианта hWnt11sp3 секретироваться оценивали, определяя его наличие в кондиционной среде. Транзитивно трансфицированные генетическими конструкциями, кодирующими исследуемые формы лиганда, клетки линии CHO культивировали 3 сут после чего кондиционную среду и клеточные лизаты инкубировали с гепарин-сефарозой. Связывание белков с гепарин-сефарозой выявляли методом Вестерн-блот анализа (рис. 3*а*). При инкубации гепарин-сефарозы с кондиционной средой происходило связывание полноразмерного и доминантно-негативного вариантов hWnt11, что достоверно показано при иммуно-



**Рис. 3.** Свойства белкового продукта сплайс-варианта hWnt11sp3 отличаются от свойств полноразмерного лиганда hWnt11 при исследовании в модельных системах. *а* – Вестерн-блот анализ связывания исследуемых форм белка hWnt11 с гепарин-сефарозой, которая проинкубирована или с лизатами клеток линии CHO, трансфицированными hWnt11-, hWnt11sp3- и Wnt11ΔC-кодирующими конструкциями (нижняя панель), или со средой, кондиционированной трансфицированными клетками (верхняя панель). В качестве отрицательного контроля использованы нетрансфицированные клетки линии CHO. *б* – Анализ влияния экспрессии разных изоформ лиганда hWnt11 на активацию канонического сигнального пути методом двойного люциферазного теста. Клетки линии Mel P трансфицировали смесью плазмид, кодирующих люциферазу “ф” под регуляцией TCF-зависимого промотора и люциферазу “р” – для контроля уровня трансфекции. Трансфекция плазмидной ДНК, кодирующей лиганд hWnt3a, использована для активации канонического сигнального пути Wnt проводили с использованием котрансфекции конструкциями, кодирующими hWnt11 (третий столбец) и hWnt11sp3 (четвертый столбец). В качестве контроля воздействия котрансфекции на модельную систему использована котрансфекция плазмидой pcDNA5/FRT/TO без вставки.

ноблотинге, в то время как новая изоформа hWnt11sp3 в культуральной среде не обнаружена. Следует отметить, что при инкубации гепарин-сефарозы с лизатами трансфицированных клеток зарегистрировано наличие всех трех изучаемых белков во внутриклеточном компартменте. Это значит, что в результате трансфекции экспрессировались все формы белка и что белковый продукт альтернативного сплайсинга hWnt11sp3, также как доминантно-негативная и полноразмерная формы hWnt11, связывается с гепарином.

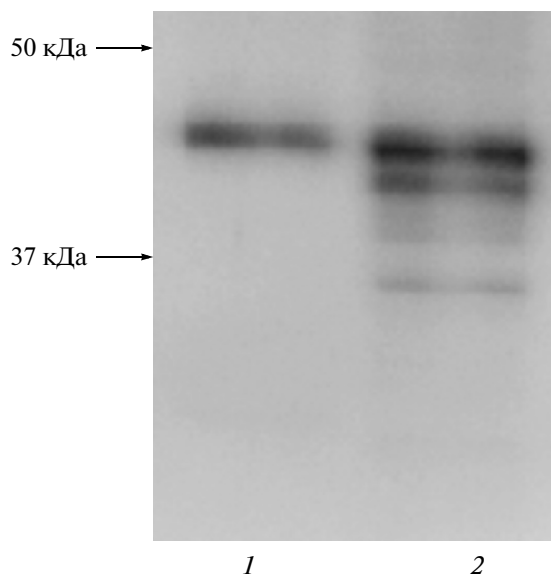
Отсутствие сплайс-варианта в кондиционной среде указывает на нарушение секреции этого белкового продукта, что отличает его от полноразмерного лиганда и позволяет предположить их различия на функциональном уровне.

**Сплайс-вариант hWnt11sp3 не ингибирует канонический сигнальный путь Wnt**

Обычно в результате активации неканонических сигнальных путей Wnt происходит реорга-

низация цитоскелета, активация различных ферментов: GTPаз, киназ, факторов транскрипции. Одно из следствий активации неканонических сигнальных путей Wnt – это ингибирование канонического сигнального пути. Именно эту характеристику мы использовали в качестве критерия функциональной активности исследуемых форм лиганда.

Влияние экспрессии hWnt11, Wnt11ΔC и hWnt11sp3 на активацию канонического сигнального пути детектировали, используя модельную систему на основе двойного люциферазного теста (рис. 3б). Клетки линии Mel P трансфицировали плазмидой, кодирующей фермент люциферазу светлячка (*Photinus pyralis*) “ф” под TCF-зависимым промотором, и плазмидой, кодирующей люциферазу морских кишечнополостных (*Renilla reniformis*) “р”. Экспрессия люциферазы “ф” происходит в ответ на активацию канонического сигнального пути, так как его прямым следствием является экспрессия генов, находящихся под контролем TCF-зависимого промотора. Экспрес-



**Рис. 4.** 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).

сия люциферазы “p” 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 модельной системы конструкцией, кодирующей лиганд hWnt3a, и детектируется благодаря увеличению уровня относительной биолюминесценции.

Воздействие на активацию сигнального пути производили при помощи котрансфекции клеток модельной системы конструкцией, кодирующей лиганд hWnt3a, и генетическими конструкциями, позволяющими экспрессировать hWnt11 и hWnt11sp3. В качестве контроля влияния трансфекции на уровень относительной биолюминесценции в активированной модельной системе использовали трансфекцию векторной плазмидой pcDNA5/FRT/TO без вставки. Установлено, что предложенная модельная система чувствительна к воздействию “неканоническим” лигандом hWnt11: его экспрессия приводит к ингибированию канонического сигнального пути. Подавление канонического сигнального пути выражается в понижении уровня экспрессии люциферазы “ф”, находящейся под контролем TCF-зависимого промотора. В то же время при экспрессии белкового продукта сплайс-варианта hWnt11sp3 ингибирования канонического сигнального пути практически не происходит.

Полученные данные свидетельствуют о том, что белковый продукт hWnt11sp3 не обладает

функциональной активностью, характерной для полноразмерного лиганда.

***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. Так как в результате альтернативного сплайсинга может происходить экспрессия нефункциональных форм лиганда, мы исследовали, сопровождается ли альтернативный сплайсинг лиганда hWnt11 экспрессией белковых продуктов сплайс-вариантов в нативных условиях. Чтобы выяснить, какие изоформы лиганда hWnt11 экспрессируются клетками линии карциномы кишечника HT29, нами проведен Вестерн-блот анализ кондиционной среды и лизатов клеток линии HT29 с использованием антител, полученных к лиганду hWnt11 (рис. 4). Кондиционную среду и клеточные лизаты инкубировали с гепарин-сефарозой, а затем связавшиеся белки детектировали с помощью антител. В результате 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.

Методом иммуноблотинга показано, 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, которые обнаружены ОТ-ПЦР-анализом, на основании чего и была выдвинута гипотеза альтернативного сплайсинга hWnt11.

Трансфицировав клетки СНО конструкциями, кодирующими полноразмерный лиганд hWnt11 и сплайс-вариант hWnt11sp3, мы показали, что полноразмерный белок секретируется в культуральную среду, тогда как белковый продукт альтернативного сплайсинга лишен этой способности. В случае клеток HT29 наблюдается аналогичная картина в отношении эндогенных белков: полноразмерная форма лиганда секретируется, а возможные изоформы меньшей молекулярной массы детектируются только в лизатах.



### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

У больных раком кишечника часто выявляют активацию канонического сигнального пути Wnt [22, 23]. Экспрессия лигандов сигнального пути Wnt в таком случае представляет собой дополнительный фактор, влияющий на статус сигнального пути. Известно, что лиганды неканонического сигнального пути могут по-разному влиять на канонический сигнальный путь в зависимости от паттерна экспрессирующихся рецепторов [13, 32]. Кроме того, “неканонические” лиганды потенциально способны активировать механизмы, влияющие на клеточную подвижность и таким образом вносить вклад в формирование агрессивного опухолевого фенотипа.

Альтернативный сплайсинг может приводить к существенному изменению функциональных свойств белковых продуктов одного и того же гена. Так, например, различные изоформы цитокинов иногда оказывают прямо противоположное действие на активность регулируемого ими сигнального пути [33, 34]. В случае сигнального пути Wnt об экспрессии различных изоформ лигандов и их функциональной активности известно чрезвычайно мало. В представленной работе впервые на молекулярном уровне показано существование изоформ “неканонического” лиганда hWnt11. Обнаруженная нами изоформа hWnt11sp3 по функциональным характеристикам существенно отличается от полноразмерного лиганда hWnt11. Во-первых, hWnt11sp3 не секретируется и, таким образом, не может действовать паракринно. Во-вторых, эта изоформа не способна ингибировать активацию сигнального пути Wnt каноническими лигандами.

Неспособность изоформы hWnt11sp3 ингибировать канонический сигнальный путь Wnt свидетельствует о том, что альтернативный сплайсинг играет существенную роль в регуляции активности сигнальных путей Wnt в клетках линии HT29.

Неконтролируемая активность канонического сигнального пути Wnt считается одним из основных факторов, определяющих развитие карциномы кишечника и используется в качестве мишени в противоопухолевой терапии этого заболевания [35, 36]. Результаты исследований экспрессии лигандов сигнального пути Wnt в опухолевом развитии указывают на вовлечение “неканонических” лигандов в формирование опухолевых фенотипов. Однако, как правило, не учитывается возможность существования различных изоформ лигандов сигнального пути Wnt. Способность “неканонических” лигандов ингибировать активность канонического сигнального пути Wnt ранее показана на множестве модельных систем. В данной работе для исследования функциональной активности изоформ hWnt11 использована модельная система на основе двойного люцифе-

разного теста. Результаты исследования подтверждают, что альтернативный сплайсинг лиганда Wnt11 может оказывать влияние на активность сигнального пути Wnt в опухолевых клетках. При этом остается открытым следующий вопрос: экспрессия изоформ лиганда Wnt11 есть следствие опухолевой трансформации клеток HT29, или альтернативный сплайсинг представляет собой механизм, который в норме используется для регуляции функциональной активности лигандов сигнального каскада Wnt. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в исследованиях, связанных с изучением лигандов Wnt, следует учитывать существование их различных изоформ, которые могут значительно различаться по своим функциональным характеристикам.

Авторы выражают свою признательность А.Ю. Суровому и И.В. Коробко за любезно предоставленные материалы, использованные в исследовании.

Секвенирование ДНК проводили в Межинститутском Центре коллективного пользования “ГЕНОМ” ИМБ РАН (<http://www.genome-centre.narod.ru/>), организованном при поддержке РФФИ.

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. Clevers H. 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. **127**, 469–480.
2. Miller J.R. 2001. The Wnts. *Genome Biol.* **3**, 3001.1–3001.15.
3. Siegfried E., Wilder E.L., Perrimon N. 1994. Components of wingless signaling in *Drosophila*. *Nature*. **367**, 76–80.
4. Miller J.R., Moon R.T. 1996. Signal transduction through beta-catenin and specification cell fate during embryogenesis. *Genes Dev.* **10**, 2527–2539.
5. Hikasa H., Egan J., Itoh K., Li X., Klymkowsky M.W., Sokol S.Y. 2010. Regulation of TCF3 by Wnt-dependent phosphorylation during vertebrate axis specification. *Dev. Cell*. **19**, 521–532.
6. Habas R., Dawid I.B., He X. 2003. Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev.* **17**, 295–309.
7. Kuhl M., Sheldahl L.C., Park M., Miller J.R., Moon R.T. 2000. The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.* **16**, 279–283.
8. van Amerongen R., Nusse R. 2009. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*. **136**, 3205–3214.
9. van Amerongen R., Mikels A., Nusse R. 2008. Alternative Wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci. Signal.* **1**, re9.

10. He X., Semenov M., Tamai K., Zeng X. 2004. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development*. **131**, 1663–1677.
11. Lu W., Yamamoto V., Ortega B., Baltimore D. 2004. Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell*. **119**, 97–108.
12. Mikels A., Minami Y., Nusse R. 2009. Ror2 Receptor Requires Tyrosine Kinase Activity to Mediate Wnt5A Signaling. *J. Biol. Chem.* **284**, 30167–30176.
13. Mikels A.J., Nusse R. 2006. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* **4**, e115.
14. Kibardin A., Ossipova O., Sokol S.Y. 2006. Metastasis-associated kinase modulates Wnt signaling to regulate brain patterning and morphogenesis. *Development*. **133**, 2845–2854.
15. Коробко И.В., Коробко Е.В., Чупикова Н.И., Ванечкин М.А., Смирнова Е.В., Киселев С.Л., Георгиев Г.П. 2002. Использование двугибридного клонирования в дрожжах для функциональной характеристики протеинкиназы МАК-V. *Молекуляр. биология*. **36**, 491–495.
16. Grumolato L., Liu G., Mong P., Mudbhary R., Biswas R., Arroyave R., Vijayakumar S., Economides A.N., Aaronson S.A. 2010. Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes Dev.* **24**, 2517–2530.
17. Katoh M. 2005. WNT/PCP signaling pathway and human cancer. *Oncol. Rep.* **14**, 1583–1588.
18. Куликова К.В., Посвятенко А.В., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Кибардин А.В., Ларин С.С. 2011. Внутриядерная локализация β-катенина не может считаться достаточным условием для активности канонического сигнального пути Wnt в клеточных линиях меланомы человека. *Молекуляр. биология*. **45**, 884–891).
19. Bittner M., Meltzer P., Chen Y., Jiang Y., Seftor E., Hendrix M., Radmacher M., Simon R., Yakhini Z., Ben-Dor A., Sampas N., Dougherty E., Wang E., Marincola F., Gooden C., Lueders J., Glatfelter A., Pollock P., Carpten J., Gillanders E., Leja D., Dietrich K., Beaudry C., Berens M., Alberts D., Sondak V. 2000. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature*. **406**, 536–540.
20. 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.
21. Weeraratna T.A., Jiang Y., Hostetter G., Rosenblatt K., Duray P., Bittner M., Trent M.J. 2002. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell*. **1**, 279–88.
22. Morin P.J., Sparks A.B., Korinek V., Barker N., Clevers H., Vogelstein B., Kinzler K.W. 1997. Activation of beta-Catenin–Tcf Signaling in colon cancer by mutations in beta-Catenin or APC. *Science*. **275**, 1787–1790.
23. Korinek V., Barker N., Morin P.J., van Wichen D., de Weger R., Kinzler K.W., Vogelstein B., Clevers H. 1997. Constitutive transcriptional activation by a beta-Catenin–Tcf complex in APC<sup>-/-</sup> colon carcinoma. *Science*. **275**, 1784–1787.
24. Suzuki H., Watkins D.N., Jair K.-W., Schuebel K.E., Markowitz S.D., Chen W.D., Pretlow T.P., Yang B., Akiyama Y., van Engeland M., Toyota M., Tokino T., Hinoda Y., Imai K., James G., Herman J.G., Baylin S.B. 2004. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat. Genet.* **36**, 417–422.
25. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю., Бурова О.С., Морозова Л.Ф., Палкина Т.Н., Козлов А.А., 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. *Вестн. РАМН*. **7**, 37–40.
26. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Морозова Л.Ф., Бурова О.С., Демидов Л.В., Палкина Т.Н., Козлов А.М., Ларин С.С., Георгиев Г.П., Ворожцов Г.Н., Гнучев Н.В. 2006. Патент на изобретение “клеточная линия mel P”. № 2287575. Российский патент.
27. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab. Press.
28. Михайлов А.Т., Смирский В.Н. 1991 *Методы иммунохимического анализа в биологии развития*. М.: Наука.
29. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680–685.
30. Smith J.C., Conlon F.L., Saka Y., Tada M. 2000. Xwnt11 and the regulation of gastrulation in *Xenopus*. *Philos. Trans R Soc. Lond. B Biol. Sci.* **355**, 923–930.
31. Bradley R.S., Brown A.M. 1990. The proto-oncogene int-1 encodes a secreted protein associated with the extracellular matrix. *EMBO J.* **9**, 1569–1575.
32. Tao Q., Yokota C., Puck H., et al. 2005. Maternal wnt11 activates the canonical wnt signaling pathway required for axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*. **120**, 857–871.
33. Park J.E., Keller G.A., Ferrara N. 1993. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol. Biol. Cell*. **4**, 1317–1326.
34. Лукьянов Е.В., Виедлоха А., Куявская Д.В., Олснес С., Козлов Ю.В. 2002. Короткая форма гепарин-связывающего EGF-подобного фактора роста с измененным EGF-доменом. *Молекуляр. биология*. **36**, 76–83.
35. He B., Reguart N., You L., Mazieres J., Xu Z., Lee A.Y., Mikami I., McCormick F., Jablons D.M. 2005. Blockade of Wnt-1 signaling induces apoptosis in human colorectal cancer cells containing downstream mutations. *Oncogene*. **24**, 3054–3058.
36. Takahashi-Yanaga F., Sasaguri T. 2007. The Wnt/β-catenin signaling pathway as a target in drug discovery. *J. Pharmacol. Sci.* **104**, 293–302.