

ПОВЫШЕНИЕ ТУМОРОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТОК РАКА ОБОДОЧНОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ НСТ116 ЗА СЧЕТ УВЕЛИЧЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ РАКОВЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ПОДАВЛЕНИИ ЭКСПРЕССИИ Е-КАДГЕРИНА

М.Д. Фармаковская, Н.В. Хромова, Б.П. Копнин, П. Б. Копнин

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Павел Борисович Копнин pbkopnin@mail.ru

Введение. Для многих злокачественных новообразований человека характерна aberrantная экспрессия или утрата Е-кадгерина, что является пусковым механизмом для эпителиально-мезенхимального перехода. Прохождение эпителиально-мезенхимального перехода, в свою очередь, может способствовать приобретению трансформированными клетками свойств так называемых раковых стволовых клеток (РСК).

Цель исследования — изучение влияния экспрессии Е-кадгерина на долю РСК в популяции клеток аденокарциномы толстой кишки человека НСТ116.

Материалы и методы. Созданы сублинии клеток НСТ116 с повышенной и подавленной экспрессией Е-кадгерина, в которых мы оценивали долю РСК с помощью тестов на минимальную прививочную дозу, колониюобразование в полужидкой среде, а также определяли профиль экспрессии маркеров плюрипотентности.

Результаты и выводы. Мы показали, что доля РСК в популяции клеток аденокарциномы толстой кишки человека НСТ116 зависит от уровня экспрессии Е-кадгерина. Подавление продукции этого белка приводит к повышенной экспрессии генов, ответственных за плюрипотентное состояние клетки, и увеличению доли РСК через активацию сигнального пути Wnt/ β -катенин. Гиперэкспрессия Е-кадгерина имеет противоположный эффект и снижает количество РСК в популяции клеток НСТ116. Таким образом, в противоопухолевой терапии колоректального рака могут быть перспективными терапевтические подходы, восстанавливающие экспрессию Е-кадгерина.

Ключевые слова: раковые стволовые клетки, эпителиально-мезенхимальный переход, Е-кадгерин, колоректальный рак

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-06-14

E-CADHERIN EXPRESSION DOWNREGULATION ELEVATES TUMOROGENIC POTENTIAL OF HUMAN COLON CANCER CELL LINE HCT116 VIA INCREASE IN CANCER STEM CELLS AMOUNT

M.D. Farmakovskaya, N.V. Khromova, B.P. Kopnin, P.B. Kopnin

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Introduction. E-cadherin aberrant expression or complete loss is common for a number of human malignant neoplasms, and can be a launching mechanism of an epithelial-mesenchymal transition. Passing through epithelial-mesenchymal transition could in turn promote to the acquisition of so called cancer stem cell phenotype by the transformed cells.

The objective of the present study is to reveal the influence of E-cadherin expression level on the amount of cancer stem cells in human colon cancer cell line HCT116.

Materials and methods. We have created cell sublines with E-cadherin up- and downregulation and assessed the percentage of cancer stem cells using tumor formation assay, clonogenic assay; we also evaluated profile of cell pluripotency markers.

Results and conclusion. We have shown that the proportion of cancer stem cells in human colon adenocarcinoma cell line HCT116 depends on the E-cadherin expression level. E-cadherin expression downregulation results in elevated expression of pluripotency genes and in the increase of proportion of cancer stem cells via activation of Wnt/ β -signalling pathway. E-cadherin upregulation has a reverse effect and decreases the amount of HCT116 cancer stem cells. Thus, E-cadherin expression restoration seems prospective in colorectal anticancer therapy.

Key words: cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition, E-cadherin, colorectal cancer

Введение

Е-кадгерин является трансмембранной кальций-зависимой адгезионной молекулой, характерной для большинства эпителиальных клеток. Он играет важную роль в эмбриогенезе и поддержании эпителиальных тканей взрослого организма, и его утрата или нарушение функций может приводить к развитию новообразований [1, 2]. Для многих злокачественных новообразований человека показано снижение или отсутствие экспрессии Е-кадгерина в результате мутаций в его гене *CDH1*, эпигенетической или транскрипционной регуляции, что позволяет рассматривать данный белок в качестве опухолевого супрессора [3]. Показано, что существует взаимосвязь между экспрессией Е-кадгерина и неблагоприятным течением заболевания. Так, в отношении злокачественных новообразований молочной железы, желудка, поджелудочной железы известно, что утрата экспрессии Е-кадгерина приводила к переходу от хорошо дифференцированной В-клеточной аденомы поджелудочной железы к инвазивной карциноме [4]; для колоректальных опухолей показано, что утрата Е-кадгерина ассоциирована с агрессивным ростом и метастазированием [5].

Известно, что утрата экспрессии Е-кадгерина трансформированными клетками может приводить к эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП) [6, 7]. В последнее время появляется все больше данных, указывающих на связь между прохождением клеток через ЭМП и приобретением ими свойств раковых стволовых клеток (РСК) [8, 9]. РСК — небольшая популяция трансформированных клеток, обладающая опухолевым потенциалом. Предполагают, что РСК возникают из нормальных стволовых клеток организма и обладают рядом свойств, позволяющих выделить их из основной массы злокачественных клеток [10, 11]. Одним из таких свойств является профиль поверхностных маркеров. Так, для РСК толстой кишки человека описаны поверхностные антигены CD133, CD44, ALCAM или фермент альдегиддегидрогеназа ALDH1 [12]. Согласно современным представлениям именно РСК являются причиной устойчивости к терапии и рецидивирования заболевания [13]. Таким образом, РСК представляют перспективную мишенью для таргетной терапии злокачественных новообразований, однако накапливаются данные, указывающие на существование сложных механизмов поддержания определенной доли РСК, возможно, за счет взаимного перехода трансформированных клеток между «стволовым» и «нестволовым» состояниями [14, 15].

Пути приобретения опухолевыми клетками фенотипа РСК изучены недостаточно, но известно, что изменения экспрессии ряда генов (*TAZ*, *WNT*, *SHH*, *DKK-1*, *PTEN*, *BMI-1*) могут приводить к изменению доли РСК в популяции опухолевых клеток [16–19].

Более того, известно, что подавление экспрессии Е-кадгерина увеличивает опухоленность трансформированных эпителиальных клеток молочной железы HMLER и клеток аденокарциномы легкого A549 [20]. Однако есть работы, показывающие, что только Е-кадгерин-положительные клетки аденокарциномы предстательной железы имеют фенотип РСК и увеличение экспрессии Е-кадгерина приводит к увеличению доли РСК [21]. Ранее нами было показано, что ингибирование фактора роста эндотелия сосудов VEGF-C приводит к увеличению экспрессии Е-кадгерина и уменьшает долю РСК в популяции клеток аденокарциномы толстой кишки человека HCT116 [22]. Принимая во внимание, что утрата Е-кадгерина в адгезионных контактах является основным событием, запускающим ЭМП, а трансформированные клетки, прошедшие ЭМП, могут приобретать свойства РСК, в настоящей работе мы изучили влияние непосредственных изменений экспрессии Е-кадгерина на проявление свойств и долю РСК в популяции клеток HCT116. Полученные данные показывают, что подавление экспрессии Е-кадгерина в клетках линии аденокарциномы толстой кишки человека HCT116 приводит к прохождению клетками ЭМП и увеличению доли РСК в популяции, в то время как увеличение экспрессии Е-кадгерина, наоборот, способствует снижению доли РСК.

Материалы и методы

Клеточные линии

В работе использовали клеточную линию аденокарциномы толстой кишки человека HCT116 (ATCC# CCL-247) и ее сублинии с измененной экспрессией гена Е-кадгерина (*CDH1*). Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и пенициллина/стрептомицина при 37 °C и 5 % CO₂.

Создание конструкций, экспрессирующих *CDH1* и мРНК к гену *CDH1*

При создании конструкции, экспрессирующей *CDH1*, кДНК данного гена (синтезированная и любезно предоставленная проф. М.С. Трояновским [23]) была клонирована в лентивирусный вектор pLenti6 (Invitrogen, США). При создании конструкции, экспрессирующей малую интерферирующую РНК гена *CDH1*, мы использовали лентивирусный вектор pLKO 1-puro (Sigma, Германия). На основе библиотеки MISSION shRNA Library (Sigma-Aldrich, Германия) были выбраны 5 малых интерферирующих РНК, гомологичных мРНК (ref NM_004360.3) человеческого гена Е-кадгерина (*CDH1*):

№ 13' — CCAGTGAACAACGATGGCATT–5' (гомологичная 1409–1429 нуклеотидной последовательности мРНК гена *CDH1*),

№ 23' – CGATTCAAAGTGGGCACAGAT–5' (344–364 нт),

№ 33' – GCAGAAATTATTGGGCTCTTT–5' (3858–3878 нт),

№ 43' – CCAAGCAGAATTGCTCACATT–5' (529–549 нт),

№ 53' – CCAACCCAAGAATCTATCATT–5' (2057–2077 нт),

и протестированы на линии клеток НСТ116; наиболее эффективно подавляли экспрессию Е-кадгерина две из них (№ 1, 2).

Для получения вектора, стабильно экспрессирующего shCDH1, были синтезированы олигонуклеотиды (Evrogen, Россия): для shCDH1№ 1 – 5'–CCGGCCAGTGAACAACGATGGCATTCTCGAGAATGGCATCGTTCACTGGTTTTTTG–3', для shCDH1№ 2 – 5'–CCGGCGATTCAAAGTGGGCACAGATCTCGAGATCTGTGCCCCACTTTGAATCGTTTTTTG–3', а также последовательности, комплементарные им. Образованный в результате гибридизации комплементарных олигонуклеотидов фрагмент двуцепочечной ДНК, в состав которого была включена повторенная через шпильчатую структуру последовательность shCDH1 (выделена жирным курсивом), гомологичная участку человеческой мРНК *CDH1*, был клонирован в вектор pLKO.1-puro по сайтам рестрикции эндонуклеаз AgeI и EcoRI. Из двух полученных конструкций для дальнейших исследований была отобрана pLKO.1-shCDH1№ 1, наиболее эффективно подавляющая экспрессию гена Е-кадгерина.

Получение клеточных сублиний с различной экспрессией Е-кадгерина

Для получения инфекционных лентивирусных частиц pLKO.1-shGFP (контроль), pLKO.1-shCDH1, pLenti6-CDH1 использовали клетки-упаковщики HEK293FT (Invitrogen, США) и реагент ExGen 500 (Fermentas, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Сбор вирусных частиц проводили каждые 12 ч в течение 72 ч, затем инфицировали клетки НСТ116. Селекцию клеток, экспрессирующих pLKO.1-shGFP и pLKO.1-shCDH1, проводили с использованием пурамицина (1мкг/мл), клеток, экспрессирующих pLenti6-CDH1, – с использованием бластицидина (1мкг/мл) в течение 5 дней.

Определение уровня экспрессии генов

Тотальную мРНК выделяли с помощью TRI Reagent (Sigma, Германия). Реакцию обратной транскрипции проводили, как описано ранее [24]. Для определения уровней экспрессии мРНК использовали праймеры:

Е-кадгерин: прямой 5'–GTCTGTAGGAAGGCA-CAGCC–3', обратный 5'–TGCAACGTCGTTAC-GAGTCA–3';

с-Мус: прямой 5'–GCTTCTCAGAGGCTTGGC-GGGAAA–3', обратный 5'–CCTGGGGGATCAAG-CGGGAGG–3';

Нестин: прямой 5'–GCGGCTGCGGGCTACT-GAAA–3', обратный 5'–ATCCAAGACGCCGGCC-CTCT–3';

Sox2: прямой 5'–TGGACAGTTACGCGCACAT–3', обратный 5'–CGAGTAGGACATGCTGTAGGT–3';

Oct3/4: прямой 5'–GTGTTTCAGCCAAAAGAC-CATCT–3', обратный 5'–GGCCTGCATGAGGGT-TTCT–3';

Wnt1: прямой 5'–AGGCAGGCCGTACGACCG-TA–3', обратный 5'–CGGGTGGGCGAATAACCG-GG–3';

α-тубулин: прямой 5'–GTTGGTCTGGAATTCT-GTCAG–3', обратный 5'–AAGAAGTCCAAGCTG-GAGTTC–3'.

Использовали для выравнивания образцов кДНК.

Вестерн-блот-гибридизация

Для приготовления тотальных белковых лизатов клетки лизировали в RIPA буфере. Пробы нормализовали по методу Бредфорда. Белки разделяли в 8–12 % полиакриламидном геле и переносили их на PVDF-мембрану (Millipore, Германия). Для выявления белков использовали антитела к Е-кадгерину (M126, TaKaRa), к β-катенину (610154, BD Transduction Laboratories, США), в качестве контроля количества нанесенного белка детектировали α-тубулин (sc-23948, Santa Cruz Biotechnology, США), использовали вторичные Alexa488-конъюгированные антитела (Invitrogen, США). Детекцию флуоресценции проводили на приборе Typhoon 9410 (GE Healthcare, США).

Иммунофлуоресцентная микроскопия

Клетки на покровном стекле фиксировали на 4-й день после посева 1 % раствором параформальдегида в течение 15 мин и метанолом в течение 5 мин при –20 °С. Клетки инкубировали с первичными антителами (см. раздел «Вестерн-блот-гибридизация») и вторичными антителами, конъюгированными с AlexaFluor594- или Alexa488-флуорохромами (Invitrogen, США). Изображения получены с помощью флуоресцентного микроскопа AxioPlan 2 (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения AxioVision (Carl Zeiss Imaging Systems).

Определение уровня активности люциферазы

Для определения TCF/LEF-транскрипционной активности использовали коммерчески доступную люциферазную лентивирусную TCF/LEF-зависимую репортерную конструкцию (Signal Lenti TCF/LEF Reporter (luc) Kit: CLS-018L, Qiagen, Германия) и си-

стему Steady-Glo Luciferase Assay System (E2510, Promega, США) согласно протоколу производителя, полученные значения нормализовали относительно содержания общего количества белка в образцах.

Определение миграционной активности клеток

В лунки 24-луночной плашки вставляли камеру Бойдена с диаметром пор 8 мкм, внутрь которой сеяли 50 000 клеток. Через 24 ч клетки, оставшиеся сверху в камере, убирали. Мигрировавшие клетки фиксировали и окрашивали трипановым синим. Миграционную активность определяли подсчетом числа клеток на нижней поверхности мембраны в 10 полях зрения (п. з.) при 200-кратном увеличении.

Определение количества клеток, исключая краситель Rhodamine 123

10^6 клеток/мл ресуспендировали в теплом растворе HBSS с добавлением 2 % эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки сначала инкубировали с 1 мг/мл красителя Rhodamine 123 (R8004, Sigma), затем добавляли 10 мг/мл красителя Propidium Iodide (P4170, Sigma). Окрашивание Rhodamine 123 детектировали с помощью проточного BD FACSCanto II (BD, США), использовали фильтры 530/30 (BP) для красителя Rhodamine 123 и 630/22 BP для красителя Propidium Iodide. В каждом эксперименте оценивали 10^7 событий. Дальнейший анализ проводили с помощью программ BD FACSDiva Software (BD, США) and WinMDI (Joseph Trotter, США).

Анализ колониеобразования в неприкрепленных условиях

200 клеток ресуспендировали в 2-кратной среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональную телячью сыворотку с 1,3 % метилцеллюлозой (Fluka, Германия), помещали на неадгезивные чашки Петри и культивировали в течение 14 дней, окрашивали кристаллическим фиолетовым. Подсчет колоний производили с помощью программы TotalLab v. 2.01, модуля Colony Counter (Nonlinear Dynamics).

Анализ скорости роста *in vitro*

Клетки рассевали в 6-луночные чашки 25 000 на каждую лунку. Для определения скорости роста проводили подсчет количества клеток в камере Горяева каждые 48 ч в течение 8 дней.

Анализ прививаемости опухолевых клеток

В работе использовали самок бестимусных мышей линии D2 × J [24] в возрасте 6–8 нед. Каждому животному подкожно прививали по 4 опухоли: 2×10^6 , 10^6 , $0,5 \times 10^6$, $0,25 \times 10^6$ клеток, суспендированных в 100 мкл физиологического раствора. Через 21 день после инъекции путем пальпации определя-

ли наличие опухоли под кожей. Эксперименты проводили трижды для подтверждения результатов.

Анализ скорости роста *in vivo*

Размер ксенографтов измеряли каждые 3 дня, их объем высчитывали по формуле: (ширина)² × (длина) × 0,5.

Продолжительность эксперимента составила 21 день, сформировавшиеся опухоли использовали для иммуногистохимического (ИГХ) окрашивания.

Иммуногистохимическое окрашивание

Ксенографты фиксировали в 4 % формальдегиде в течение 24 ч и заключали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм подвергали депарафинированию, затем обрабатывали в цитратном буфере для демаскировки антигена pH6.0 (Dako, S1699) при 94 °C 40 мин. Активность эндогенной пероксидазы ингибировали 3 % H_2O_2 10 мин. После этого срезы инкубировали с первичными антителами крысы к CD34 (BD Pharmingen, 553731), в течение 1 ч, затем со вторичными антителами, меченными биотином (BD Pharmingen, 559286) в течение 30 мин, далее 15 мин со стрептавидин-HRP-проявочной системой (Dako, K0690). Визуализацию окрашивания проводили, используя систему DAB+ (Dako, K3468) согласно протоколу фирмы. После этого препараты докрашивали гематоксилином Майера (Glycergel, Dako). После демаскировки все инкубации проводили при комнатной температуре.

Подсчет CD34⁺ капилляров

Препараты опухолевых тканей использовали для проведения морфометрического анализа присутствия кровеносных капилляров, выявляемых с помощью ИГХ-окрашивания на CD34. CD34⁺-структуры с просветами, длина которых ≥ 100 мкм, подсчитывали при 100-кратном увеличении, их плотность на срезе опухоли оценивали по среднему количеству. Анализировали по 3–7 п. з. для каждой опухоли в экспериментальной группе.

Статистика

Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего по результатам как минимум 3 независимых экспериментов. Для статистической оценки результаты были проанализированы с помощью t-теста Стьюдента. Значения считали статистически достоверными при $p \leq 0,05$. Все эксперименты были проведены не менее 3 раз.

Результаты и обсуждение

Чтобы изучить влияние изменений экспрессии E-кадгерина на свойства клеток аденокарциномы толстой кишки человека и его роль в формировании фенотипа РСК, мы создали сублинии клеток HCT116

с повышенной и подавленной экспрессией Е-кадгерина (*CDH1*). Для создания сублинии с гиперэкспрессией *CDH1* последовательность гена *CDH1* человека была клонирована в лентивирусный вектор pLenti6, содержащий CMV-промотор, обеспечивающий постоянную экспрессию целевого гена, и ген устойчивости к бластицидину для селекции инфицированных клеток (рис. 1а). Последовательности малых интерферирующих РНК к мРНК гена *CDH1* человека были клонированы в лентивирусный вектор pLKO.1, экспрессия которого стабильно подавляла продукцию Е-кадгерина в клетках НСТ116. Мы отметили, что клетки с подавленной экспрессией Е-кадгерина утрачивали часть эпителиальных и приобретали некоторые мезенхимальные черты: наблюдалось ослабление межклеточных контактов, уменьшение количества β -катенина (см. рис. 1а) и его частичная транслокация в ядро (рис. 1б). Клетки приобретали веретеновидную форму и повышенную миграционную активность (рис. 1в). Сублиния клеток с гиперэкспрессией Е-кадгерина и контрольная линия сохраняли исходный фенотип при более выраженных межклеточных контактах в клетках с повышенной экспрессией Е-кадгерина. Таким образом, мы предположили, что клетки с подавленной экспрессией Е-кадгерина могли приобретать некоторые черты ЭМП. Известно, что утрата экспрессии Е-кадгерина (в результате мутаций, репрессии транскрипции и т. д.) трансформированными клетками приводит к прохождению ЭМП [25]. Ранее на модели аденокарциномы поджелудочной железы было показано, что переход между неинвазивной аденомой и инвазивной карциномой ассоциирован с утратой экспрессии Е-кадгерина и прохождением ЭПМ, кроме того, было показано, что утрата мембранного β -катенина коррелировала с инвазивным фенотипом и агрессивным течением некоторых типов колоректального рака [25, 26].

Поскольку мы наблюдали транслокацию β -катенина в ядро при подавлении экспрессии Е-кадгерина, мы проверили, будет ли при этом активироваться сигнальный путь Wnt/ β -катенин. Во-первых, мы обнаружили многократное увеличение экспрессии *Wnt1*, а также одного из эффекторов данного сигнального каскада — онкогена *c-Myc* (рис. 1е). Во-вторых, с помощью люциферазного анализа TCF/Lef-репортера мы показали, что подавление Е-кадгерина при экспрессии sh*CDH1* действительно приводит к увеличению TCF/Lef-зависимой транскрипционной активности (рис. 1д) и активации сигнального каскада Wnt/ β -катенин в клетках НСТ116.

Известно, что данный сигнальный каскад может регулировать плюрипотентность стволовых клеток в ходе развития, мы проанализировали уровни мРНК некоторых генов плюрипотентности. Мы отметили

повышенную экспрессию генов *Нестин*, *ОСТ3/4*, *SOX2* в сублинии клеток НСТ116 с подавленным Е-кадгеринном (рис. 2). Полагаем, что утрата экспрессии Е-кадгерина может способствовать повышению экспрессии транскрипционных факторов *ОСТ3/4* и *SOX2*, отвечающих за поддержание состояния «стволовости», что, в свою очередь, приводит к приобретению свойств РСК. Так, в работе N. Oshima и соавт. показано, что, если в клетках карциномы толстой кишки гиперэкспрессировать транскрипционные факторы *ОСТ3/4*, *SOX2* и *KLF4*, такие клетки приобретут свойства РСК [27]. Более того, в ряде исследований показано, что экспрессия генов *SOX2* и *ОСТ3/4* ассоциируется с более агрессивным фенотипом опухоли и неблагоприятным прогнозом как для злокачественных опухолей толстой кишки и желудка, так и для злокачественных опухолей других локализаций [28–30].

Принимая во внимание, что повышенная экспрессия данных генов характерна не только для «нормальных» стволовых клеток, но и для РСК, мы решили проверить, как изменения экспрессии Е-кадгерина будут влиять на долю клеток со свойствами РСК в популяции НСТ116 (рис. 3). Для этого мы провели ряд тестов, считающихся «золотым стандартом» для выявления РСК. Сначала мы проверили активность ABC-транспортеров в сублиниях НСТ116 с повышенной и пониженной экспрессией Е-кадгерина, для чего изучили содержание в клетках красителя Rhodamine 123 с помощью проточного цитофлуориметра. Согласно современным представлениям РСК являются основной причиной устойчивости опухолей к химиотерапии за счет феномена, названного множественной лекарственной устойчивостью, причина которого, в свою очередь, заключается в повышенной активности ABC-транспортеров [31], являющейся важнейшей характеристикой РСК. Мы показали, что количество неокрашенных клеток было в 1,8 раза выше в сублинии с пониженной экспрессией и в 1,6 раза ниже в сублинии с повышенной экспрессией Е-кадгерина (рис. 3а).

Способность расти в неприкрепленных условиях является еще одним важным свойством РСК, используемым в некоторых работах для получения популяции, обогащенной РСК [32], поэтому мы протестировали способность полученных нами сублиний НСТ116 формировать колонии в полужидкой среде. Клетки с подавленной экспрессией Е-кадгерина формировали в 2,5 раза большее число колоний по сравнению с контрольной сублинией (рис. 3б), а количество колоний, сформированных клетками с увеличенной экспрессией Е-кадгерина, было меньше. Главным свойством, позволяющим считать опухолевую клетку РСК, является способность этой клетки формировать новую опухоль при инъекции животному с иммунодефици-

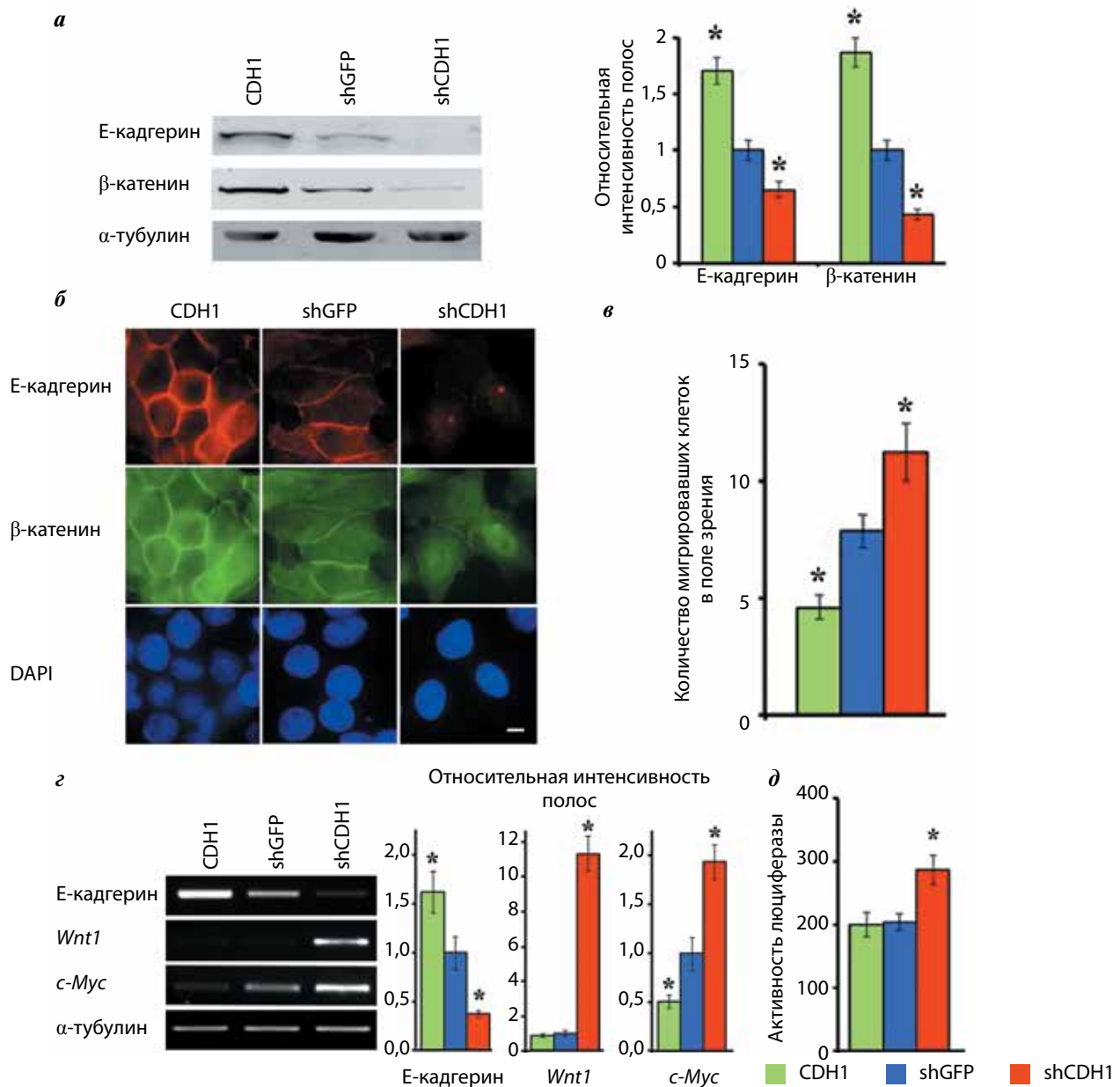


Рис. 1. Влияние изменения экспрессии E-кадгерина на морфологические характеристики и активацию сигнального каскада Wnt/β-катенин в клетках HCT116: а — вестерн-блот-анализ экспрессии E-кадгерина и β-катенина, α-тубулин использован для контроля количества нанесенных образцов. Слева представлены репрезентативные блоты, справа — относительная интенсивность полос; б — иммунофлуоресцентное окрашивание сублиний HCT116 антителами к E-кадгерину и β-катенину. Отрезок — 5 мкм; в — миграционная активность сублиний HCT116 в камере Бойдена; г — анализ экспрессии генов Wnt1 и c-Myc. Слева — результаты одного из репрезентативных анализов полимеразной цепной реакции; α-тубулин использован для контроля количества нанесенных образцов. Справа — количественный анализ экспрессии генов; д — активность люциферазы в сублиниях HCT116 с введенной репортерной конструкцией, экспрессирующей ген люциферазы под контролем промотора TCF/Lef. Различия между значениями контрольной (shGFP) и экспериментальных групп, достоверные по критерию Стьюдента ($p \leq 0,05$), отмечены звездочкой

том. Для того чтобы оценить туморогенность полученных сублиний HCT116, мы определяли минимальную прививочную дозу, вызывающую подкожный рост новой опухоли у бестимусных мышей. Оказалось, что минимальная прививочная доза для линии с повышенной экспрессией E-кадгерина была выше, а для сублинии с подавленным E-кадгерином — ниже по сравнению с контрольной линией (см. таблицу). Проведенные

эксперименты указывают на то, что доля РСК в популяции клеток аденокарциномы толстой кишки человека HCT116 зависит от уровня экспрессии E-кадгерина.

Параллельно с оценкой туморогенности сублиний HCT116 мы исследовали скорость роста их ксенографтов. Оказалось, что как увеличение, так и подавление E-кадгерина приводит к торможению опухолевого роста (рис. 4б). Такой эффект объясняется,

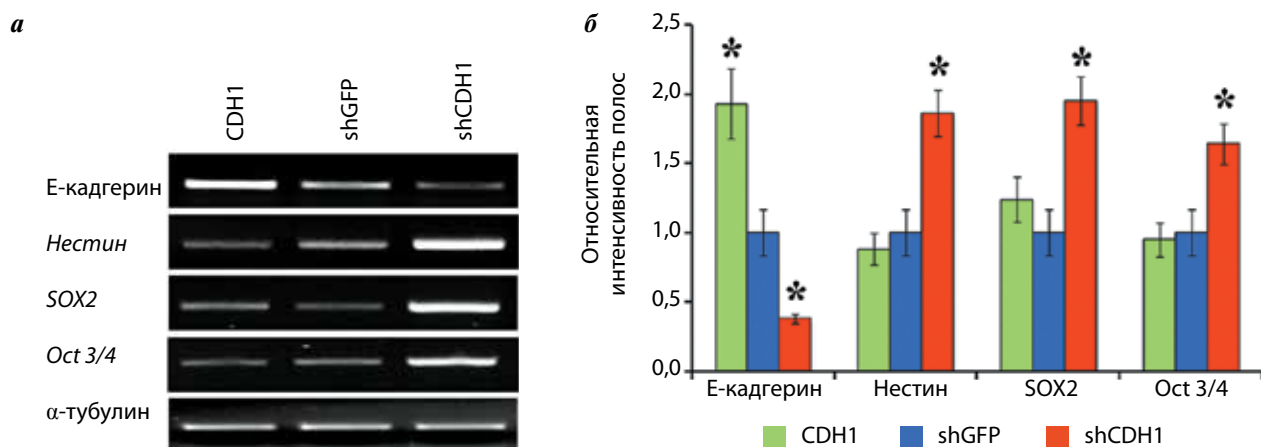


Рис. 2. Влияние изменения экспрессии *E*-кадгерина на экспрессию генов плюрипотентности в клетках *HCT116*. *a* — результаты одного из репрезентативных анализов полимеразной цепной реакции; α -тубулин использован для контроля количества нанесенных образцов. *б* — количественный анализ экспрессии генов. Различия между значениями контрольной (*shGFP*) и экспериментальных групп, достоверные по критерию Стьюдента ($p \leq 0,05$), отмечены звездочкой

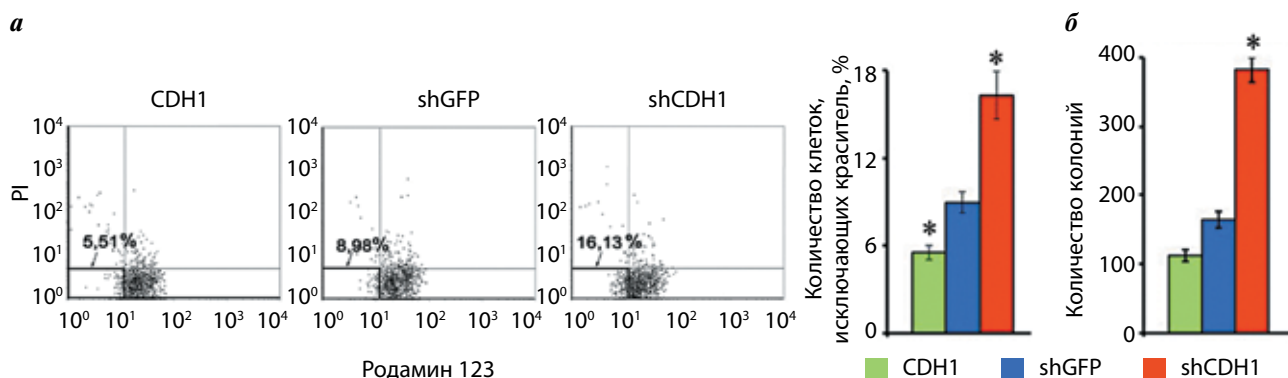


Рис. 3. Влияние изменения экспрессии *E*-кадгерина на долю клеток со свойствами РСК в линии *HCT116*: *a* — активность АВС-транспортеров. Слева — гистограммы проточной цитометрии (нижний левый квадрант — живые клетки, исключая краситель Rhodamine 123). Двойная окраска: Rho123 — Rhodamine 123, PI — пропидий йодид. Справа — количественный анализ доли клеток, исключая краситель; *б* — количественный анализ клоногенной активности клеток *HCT116*. Различия между значениями контрольной (*shGFP*) и экспериментальных групп, достоверные по критерию Стьюдента ($p \leq 0,05$), отмечены звездочкой

Влияние изменения экспрессии *E*-кадгерина на минимальную прививочную дозу клеток *HCT116*

Сублиния <i>HCT116</i>	Прививаемость, %			
	2×10^6	1×10^6	$0,5 \times 10^6$	$0,25 \times 10^6$
CDH1	100	75	40	0
shGFP	100	80	50	0
shCDH1	100	100	100	0

во-первых, замедленной пролиферацией *in vitro* клеток *HCT116* с измененной экспрессией *E*-кадгерина (рис. 4а) и, во-вторых, сниженной плотностью кровеносных капилляров в ксенографтах (рис. 4б), так как васкуляризация является одним из лимитирующих факторов роста опухоли. Плотность капилляров (CD34⁺-структур) в ксенографтах *HCT116* составляла $2,8 \pm 0,4$ на п. з., а при изменении экспрессии *E*-кадгерина уменьшалась до $1,5 \pm 0,3$.

Таким образом, подавление *E*-кадгерина в клетках *HCT116* стимулирует опухолевую прогрессию за счет индукции ЭМП, приобретения клетками свойств РСК и поддержания их доли в популяции, но не за счет пролиферативной активности клеток и их способности индуцировать васкуляризацию опухолевой ткани. Однако ранее нами было показано, что пониженная экспрессия *E*-кадгерина в клетках линии аденокарциномы легкого человека A549 способствует не только

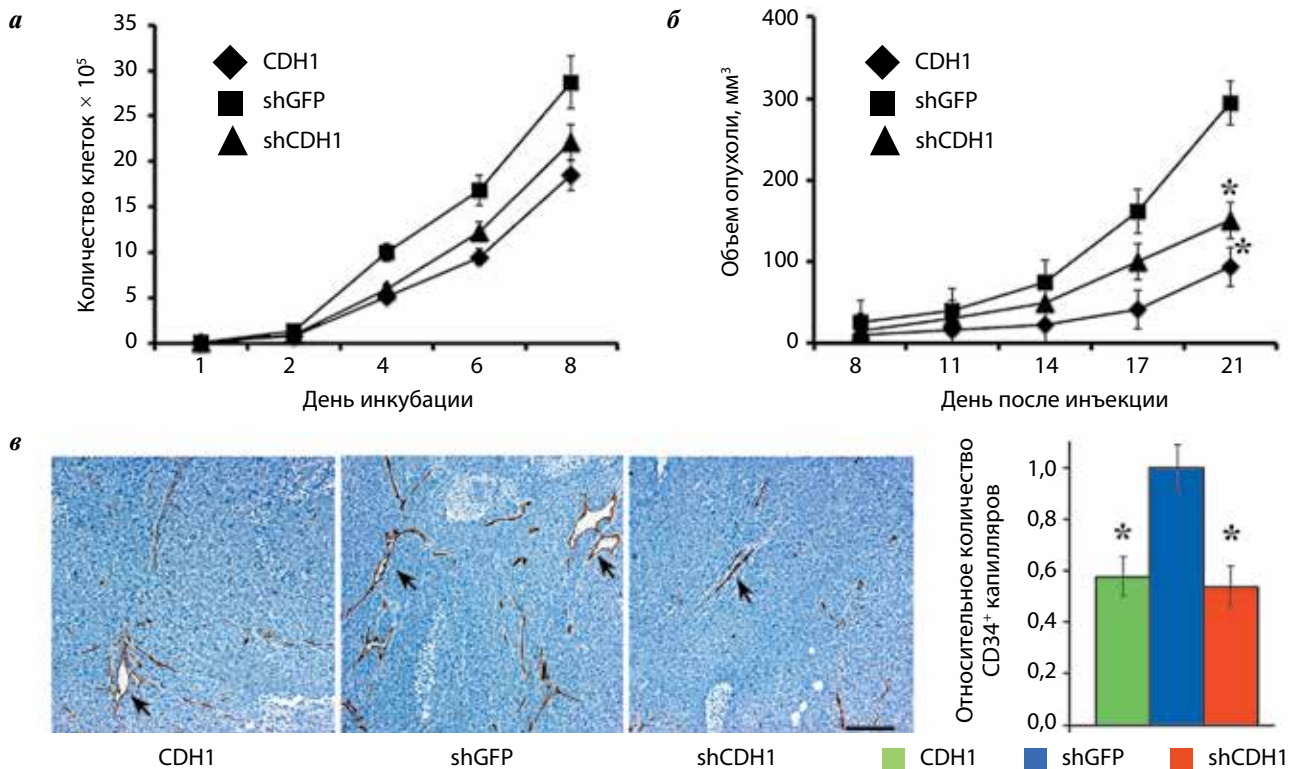


Рис. 4. Влияние изменения экспрессии Е-кадгерина на скорость роста клеток HCT116 *in vitro* и *in vivo* и васкуляризацию ксенографтов: а — кинетика роста клеток *in vitro*. Каждая точка — средние величины для 3 лунок; представлены типичные данные одного из 3 экспериментов; б — кинетика роста подкожных ксенографтов после прививки бестимусным мышам. Приведены типичные данные, полученные при анализе 8–12 опухолей в каждом из 3 экспериментов; в — васкуляризация ксенографтов HCT116 с измененной экспрессией Е-кадгерина. Слева — ИГХ-окрашивание срезов ксенографтов на CD34. Представлены типичные п. з. для каждой экспериментальной группы. Стрелками показаны CD34⁺ капилляры ≥ 100 мкм. Отрезок — 5 мкм. Справа — количественный анализ CD34⁺ капилляров длиной ≥ 100 мкм. Для каждой экспериментальной группы проанализировано не менее 25 п. з. Различия между значениями контрольной (shGFP) и экспериментальных групп, достоверные по критерию Стьюдента ($p \leq 0,05$), отмечены звездочкой

приобретению ими свойств РСК, но и увеличению скорости роста *in vivo* и способности стимулировать ангиогенез в опухоли [20]. По-видимому, такое различие во влиянии Е-кадгерина на ростовые характеристики неопластических клеток разного гистогенетического типа имеет различные механизмы, что требует дальнейшего изучения.

Заключение

Итак, полученные результаты показывают, что подавление экспрессии Е-кадгерина приводит к активации сигнального пути Wnt/ β -катенин, что, с одной стороны, индуцирует ЭМП и может способствовать приобретению клетками свойств РСК. С другой стороны, активация сигнального пути Wnt/ β -катенин увеличивает экс-

прессию генов плюрипотентности и также может способствовать приобретению трансформированными клетками черт РСК. Таким образом, утрата Е-кадгерина может поддерживать долю РСК в популяции клеток аденокарциномы толстой кишки и может быть одним из механизмов перехода трансформированной клетки в «стволовое» состояние. Поскольку именно РСК являются основной причиной рецидивирования и метастазирования злокачественных опухолей, представляется перспективной разработка терапевтических подходов, способных восстанавливать экспрессию Е-кадгерина и функциональные межклеточные контакты.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (соглашение № 14-15-00467).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Stemmler M.P. Cadherins in development and cancer. *Molecular Biosystems* 2008;4(8):835–50. <http://dx.doi.org/10.1039/b719215k>. PMID: 18633485.

2. van Roy F., Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and Molecular Life Science* 2008;65(23):3756–88.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00018-008-8281-1>. PMID: 18726070.

3. Rodriguez F.J., Lewis-Tuffin L.J., Anastasiadis P.Z. E-cadherin's dark side:

- possible role in tumor progression. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012;1826(1):23–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.03.002>. PMID: 22440943.
4. Perl A.K., Wilgenbus P., Dahl U. et al. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 2009;392(6672):190–3. PMID: 9515965.
5. Kim S.A., Inamura K., Yamauchi M. et al. Loss of CDH1 (E-cadherin) expression is associated with infiltrative tumor growth and lymph node metastasis. *British Journal of Cancer* 2016; 114(2):199–206. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2015.347>. PMID: 26742007.
6. Spaderna S., Schmalhofer O., Hlubek F. et al. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions during cancer progression. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 2007;91:21–8. PMID: 18314592.
7. Фармаковская М.Д., Хромова Н.В., Рыбко В.А., Копнин П.Б. Роль эпителиально-мезенхимального перехода в регуляции свойств раковых стволовых клеток солидных опухолей. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;4:3–8.
8. Mani S.A., Guo W., Liao M.J. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133(4):704–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>. PMID: 18485877.
9. Polyak K., Weinberg R.A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews Cancer* 2009;9(4):265–73. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2620>. PMID: 19262571.
10. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414(6859):105–11. <http://dx.doi.org/10.1038/35102167>. PMID: 11689955.
11. Scheel C., Weinberg R.A. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Seminars in Cancer Biology* 2012;22(5–6):396–403. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.04.001>. PMID: 22554795.
12. Kozovska Z., Gabrisova V., Kucerova L. Colon cancer: cancer stem cells markers, drug resistance and treatment. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2014; 68(8):911–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2014.10.019>. PMID: 25458789.
13. Singh A., Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 2010;29(34):4741–51. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2010.215>. PMID: 20531305.
14. Gupta P.B., Fillmore C.M., Jiang G. et al. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell* 2011;146(4):633–44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.026>. PMID: 21854987.
15. Chaffer C.L., Brueckmann I., Scheel C. et al. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108(19):7950–5. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1102454108>. PMID: 21498687.
16. Cordenonsi M., Zanconato F., Azzolin L. et al. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* 2011;147(4):759–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.048>. PMID: 22078877.
17. Cai C., Zhu X. The Wnt/b-catenin pathway regulates self-renewal of cancer stem-like cells in human gastric cancer. *Molecular Medicine Reports* 2012;5(5):1191–6. PMID: 22367735.
18. Liu S., Dontu G., Mantle I.D. et al. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Research* 2006;66(12):6063–71. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0054>. PMID: 16778178.
19. Korkaya H., Paulson A., Charafe-Jauffret E. et al. Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/beta-catenin signaling. *PLoS Biology* 2009;7(6):e1000121. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000121>. PMID: 19492080.
20. Farmakovskaya M., Khromova N., Rybko V. et al. E-cadherin repression increases amount of cancer stem cells in human A549 lung adenocarcinoma and stimulates tumor growth. *Cell Cycle* 2016;15(8):1084–92. <http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2016.1156268>. PMID: 26940223.
21. Bae K.M., Su Z., Frye C. et al. Expression of pluripotent stem cell reprogramming factors by prostate tumor initiating cells. *Journal of Urology* 2010; 183(5):2045–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2009.12.092>. PMID: 20303530.
22. Khromova N., Kopnin P., Rybko V., Kopnin B.P. Downregulation of VEGF-C expression in lung and colon cancer cells decelerates tumor growth and inhibits metastasis via multiple mechanisms. *Oncogene* 2012;31(11):1389–97. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.330>. PMID: 21804602.
23. Chitaev N.A., Troyanovsky S.M. Adhesive but not lateral E-cadherin complexes require calcium and catenins for their formation. *The Journal of Cell Biology* 1998;142(3):837–46. PMID: 9700170.
24. Logunov D.Y., Ilyinskaya G.V., Cherenova L.V. et al. Restoration of p53 tumor-suppressor activity in human tumor cells *in vitro* and in their xenografts *in vivo* by recombinant avian adenovirus CELO-p53. *Gene Therapy* 2004;11:79–84. PMID: 14681700.
25. Steinestel K., Eder S., Schrader A.J., Steinestel J. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition. *Clinical and Translational Medicine* 2014;3:17. <http://dx.doi.org/10.1186/2001-1326-3-17>. PMID: 25050175.
26. Kevans D., Wang L.M., Sheahan K. et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) protein expression in a cohort of stage II colorectal cancer patients with characterized tumor budding and mismatch repair protein status. *International Journal of Surgical Pathology* 2011;19(6):751–60. <http://dx.doi.org/10.1177/1066896911414566>. PMID: 21791486.
27. Oshima N., Yamada Y., Nagayama S. et al. Induction of cancer stem cell properties in colon cancer cells by defined factors. *PLoS One* 2014;9(7):e101735. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0101735>. PMID: 25006808.
28. Zhang X., Hua R., Wang X. et al. Identification of stem-like cells and clinical significance of candidate stem cell markers in gastric cancer. *Oncotarget* 2016; 7(9):9815–31. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.6890>. PMID: 26769843.
29. Talebi A., Kianersi K., Beiraghdar M. Comparison of gene expression of SOX2 and OCT4 in normal tissue, polyps, and colon adenocarcinoma using immunohistochemical staining. *Advanced Biomedical Research* 2015;4:234. <http://dx.doi.org/10.4103/2277-9175.167958>. PMID: 26645019.
30. Habu N., Imanishi Y., Kameyama K. et al. Expression of Oct3/4 and Nanog in the head and neck squamous carcinoma cells and its clinical implications for delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2015;15:730. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-015-1732-9>. PMID: 26483189.
31. Alisi A., Cho W.C., Locatelli F., Fruci D. Multidrug resistance and cancer stem cells in neuroblastoma and hepatoblastoma. *International Journal of Molecular Science* 2013;14(12):24706–25; <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-015-1732-9>. PMID: 26483189.
32. Singh S.K., Clarke I.D., Terasaki M. et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumours. *Cancer Research* 2003;63(18):5821–8; PMID: 14522905.