

УДК 616-006.81-092.4:576.3.08

КОЭКСПРЕССИЯ ВИМЕНТИНА И ЦИТОКЕРАТИНОВ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Т.А. Богуш¹, С.А. Калюжный¹, А.А. Башарина¹, Е.А. Богуш¹, В.Ю. Кирсанов²,
В.С. Косоруков¹, О.С. Бурова¹, М.М. Давыдов², М.А. Барышникова¹

(¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации; ²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет); *e-mail: tatbogush@mail.ru)

Методом двойного иммунофлуоресцентного окрашивания и проточной цитофлуориметрии при исследовании 7 клеточных линий выявлена молекулярная гетерогенность клеток метастатической меланомы человека. Показано, что лишь незначительная популяция клеток (до 10%) презентует только основной маркер меланомы – виментин. Существенно большее число клеток (от 25 до 50%) экспрессируют только эпителиальные цитокератины. Впервые выявлен доминирующий молекулярный фенотип – коэкспрессия виментина и цитокератинов в 50–80% клеток исследованных линий меланом. Предполагается, что именно этот фенотип клеток меланомы может рассматриваться как молекулярный маркер агрессивности и метастатического потенциала новообразований.

Ключевые слова: иммунофлуоресцентный анализ, проточные цитофлуориметр, виментин, цитокератины, меланома.

До настоящего времени основным молекулярным маркером меланом, как в опухолях человека и животных, так и в культурах клеток, служит белок промежуточных филаментов разных тканей мезодермального происхождения. При этом в ряде случаев в клетках меланомы выявляются и эпителиальные промежуточные филаменты – цитокератины. Впервые это было продемонстрировано в конце 80-х годов XX в. [1].

В дальнейшем экспрессия эпителиальных цитокератинов, наряду с виментином, была подтверждена при исследовании не только культур клеток, но и ткани меланомы человека [2, 3]. Более того, при повышении уровня экспрессии цитокератинов было показано изменение ряда характеристик клеток меланомы – увеличение миграционной активности на культурах клеток и метастатического потенциала в опытах на животных [4]. При этом нокаут гена белка цитокератина 18 приводил к уменьшению миграционной активности по сравнению с исходной клеточной культурой [4].

Заметим, что аналогичные изменения в поведении клеток отмечены при так называемом феномене эпителиально-мезенхимальной трансформации [5]. В этом случае *de novo* экспрессия

мезенхимального белка виментина в эпителиальных опухолевых клетках, экспрессирующих специфические цитокератины, представляет собой клинически значимый неблагоприятный маркер агрессивности течения онкологического заболевания [6, 7].

Попытки оценить прогностическую значимость экспрессии в ткани меланомы эпителиальных цитокератинов не привели к определенному выводу [2, 8]. По нашему мнению, эта неопределенность обусловлена тем, что не решен фундаментальный вопрос: что означает выявление в культуре клеток или ткани меланомы, наряду с виментином, цитокератинов? Следует это рассматривать как экспрессию белков в разных опухолевых клетках или коэкспрессию белков в одних и тех же опухолевых клетках?

Мы попытались ответить на этот вопрос при исследовании экспрессии и коэкспрессии виментина и цитокератинов в культурах клеток меланомы человека, которые были получены и запатентованы ранее.

Материалы и методы

Исследование проведено на шести клеточных линиях меланомы mel Mtp, mel H, mel Rac,

mel Kor, mel Ibr, mel IL, полученных и запатентованных в лаборатории, а также на линии SK-MEL-2 (ATCC HTB-68) из коллекции The Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. Все клеточные линии получены из метастатических узлов меланомы кожи в мягкие ткани и лимфоузлы.

В работе использован ассоциированный с проточной цитометрией метод двойного иммунофлуоресцентного анализа, разработанный и запатентованный ранее в нашей лаборатории [9, 10]. Одноклеточную суспензию в течение 15–20 ч инкубировали с первичными моноклональными антителами к широкому спектру цитокератинов (панцитокератины, клон MNF116, «ДАКО», США), затем в течение 1 ч инкубировали с антителами к мезенхимельному белку виментину (клон SP20, «BIOCARE», США) и 1,5 ч – с вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромами DyLight488 (ab96899, Великобритания) или DyLight650 (ab96899, Великобритания). После этого для удаления из анализа дегриса и эритроцитов клетки в течение 15 мин инкубировали с красителем ДНК Hoechst 33258 («Sigma-Aldrich», США).

Флуоресценцию клеток измеряли на проточном цитофлуориметре «Navios» («Beckman Coulter», США). Для визуализации распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции в разных каналах проточного цитофлуориметра использовали точечные диаграммы, построенные в программе WinMDI

2.9. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 7.0 («GraphPad Software», США).

Результаты и обсуждение

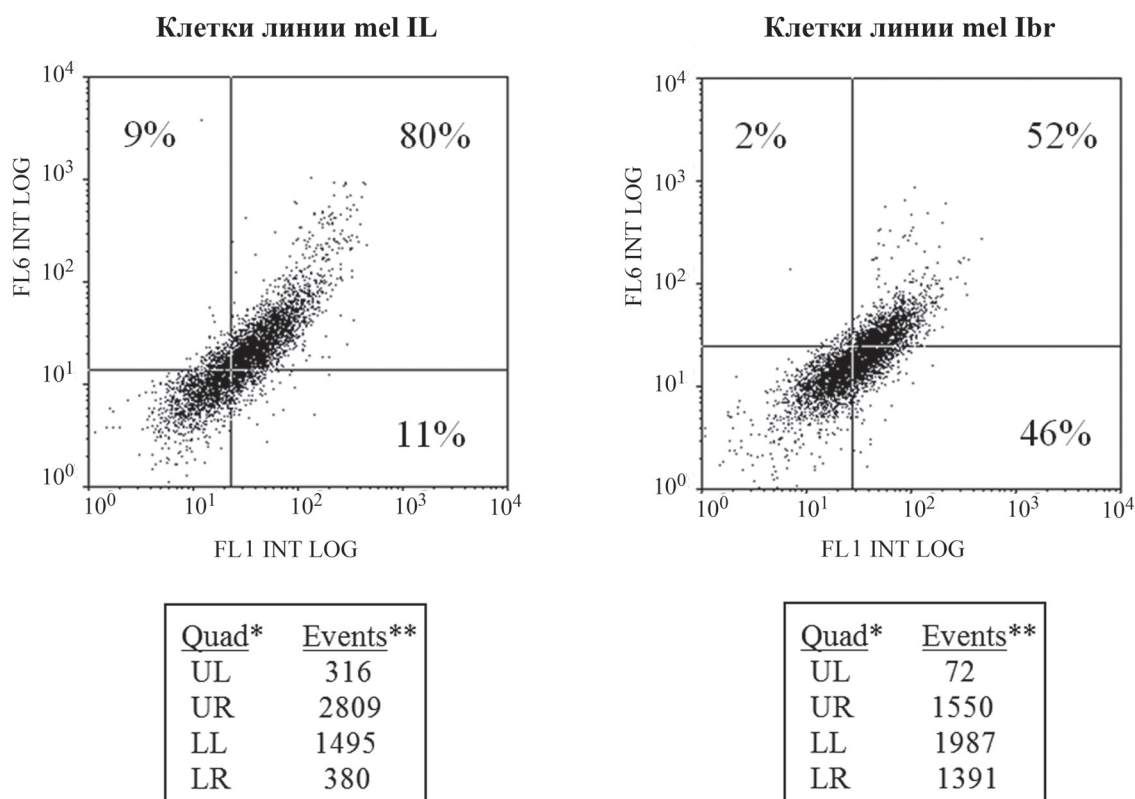
Результаты оценки в культурах клеток меланомы человека показателей экспрессии виментина и цитокератинов, а также коэкспрессии маркёров представлены в таблице. В исследованных культурах меланом содержание клеток, экспрессирующих только основной молекулярный маркёр меланом – виментин, было минимальным и колебалось от 1 до 12%. Доля клеток, экспрессирующих только эпителиальные цитокератины, была существенно более значительной. Лишь в двух культурах клеток (№ 1 и № 5) содержание клеток, экспрессирующих цитокератины, составляло менее 20%, тогда как в остальных – от 24 до 46%. Важно отметить, что при оценке коэффициента корреляции Спирмена не было выявлено связи между двумя этими показателями ($r = -0,67$; 95% CI: $(-0,94) - 0,14$; $p = 0,09$).

Иной оказалась ситуация с количеством клеток, коэкспрессирующих оба маркёра в одних и тех же клетках (виментин и цитокератины). Видно, что разброс значений этого показателя значительно меньше по сравнению с показателями экспрессии только виментина или только цитокератинов, однако в некоторых случаях различия достигали полутора раз (например, № 4 и № 2).

Доля клеток, экспрессирующих мезенхимальный маркёр виментин и эпителиальные цитокератины в культурах клеток меланомы человека

Номер образца	Линия клеток меланомы	Доля клеток, экспрессирующих маркёры, %*		
		только виментин	только цитокератин	коэкспрессия виментина и цитокератина
1	mel Mtp	1	39	60
2	mel IL	9	11	80
3	mel H	6	17	77
4	mel Ibr	2	46	52
5	mel Kor	1	25	74
6	mel Rac	12	24	64
7	SK-MEL-2	1	46	53

*Представлены результаты одного из трех анализов, при повторном проведении которых различия в значениях показателей не превысили 3%; **долю клеток (%), экспрессирующих маркёры, рассчитывали по отношению к суммарному числу окрашенных клеток.



Точечные диаграммы распределения клеток меланомы по интенсивности флуоресценции при количественной оценке уровня экспрессии виментина, цитокератинов или коэкспрессии этих маркёров. По оси абсцисс – интенсивность внутриклеточной флуоресценции (усл. ед.) красителя DyLight488, по оси ординат – интенсивность внутриклеточной флуоресценции (усл. ед.) красителя DyLight650. В таблицах под диаграммами: Quad* – обозначение квадранта, UL – верхний левый (клетки, экспрессирующие виментин), UR – верхний правый (клетки, коэкспрессирующие виментин и цитокератины), LL – нижний левый (автофлуоресценция клеток после инкубации с вторичными антителами) и LR – нижний правый (клетки, экспрессирующие цитокератины); Events** – число клеток в каждом квадранте; долю клеток (процентное содержание указано на рисунках в квадрантах) с экспрессией маркёра рассчитывали относительно суммы окрашенных клеток

Реальные точечные диаграммы, полученные при двойном иммунофлуоресцентном окрашивании клеточных культур меланомы линий mel II и mel Ibr представлены на рисунке.

Видно, что в культуре клеток линии mel II подавляющее число клеток (80%) составляет популяция с фенотипом коэкспрессии виментина и цитокератинов, тогда как в культуре Ibr доля таких клеток в 1,5 раза меньше (52%). Более того, культуры значительно отличаются и по количеству клеток, экспрессирующих только цитокератины (11 и 46% в клетках линии mel II и mel Ibr соответственно). Что касается клеток, экспрессирующих только виментин, то их доля низка в обоих случаях (2 и 9%).

Таким образом, эти результаты в совокупности с данными, представленными в таблице, демонстрируют значительные фенотипические различия исследованных клеточных культур меланомы человека.

Заключение

При исследовании клеточных линий меланомы человека выявлены различия количественных показателей экспрессии и коэкспрессии мезенхимального маркёра виментина и эпителиальных цитокератинов, что свидетельствует о выраженной молекулярной гетерогенности клеток меланомы. Подчеркнем, что речь идет о гетерогенности именно клеток, а не культур, так как экспрессия двух маркёров оценена одновременно в каждой из исследованных клеток. Это стало возможным благодаря применению разработанного авторами метода двойного иммунофлуоресцентного окрашивания с использованием проточной цитофлуориметрии.

Анализ полученных результатов показывает, что лишь незначительная популяция клеток (до 10%) презентует только основной маркёр меланомы – виментин. Существенно большее число клеток меланомы в культуре (от 25 до 50%)

может экспрессировать только эпителиальные цитокератины. С нашей точки зрения, особенно важным представляется то, что во всех культурах отчетливо выявляется доминирующий молекулярный фенотип клеток. Это клетки, коэкспрессирующие не только виментин, но и разные эпителиальные цитокератины.

Таким образом, удалось ответить на поставленный в работе вопрос: что означает описанная в литературе экспрессия в культурах клеток меланомы виментина и цитокератинов – экспрессию маркёров в разных клетках или коэкспрессию в одних и тех же опухолевых клетках? Показано, что молекулярный фенотип клеток меланомы в культуре гетерогенный и, наряду с клетками, экспрессирующими только один маркёр, доминирующая популяция презентует и виментин, и цитокератины. Возможно, это характерная особенность исследованных культур клеток, так как все они получены из ткани метастазов меланомы (см. раздел «Материалы и методы»).

Возвращаясь к работе, в которой было показано, что выявление в культурах меланомы эпителиальных цитокератинов коррелирует

с повышенным миграционным и метастатическим потенциалам клеток, а нокаут генов цитокератинов, напротив, уменьшает проявление этих агрессивных свойств клеток меланомы [4], можно предположить, что именно количество клеток, коэкспрессирующих виментин и цитокератины, а не уровень экспрессии одного или другого маркёра может характеризовать агрессивность и метастатический потенциал новообразования. По существу, прослеживается прямая аналогия с известным фактом, что потенциально более агрессивны эпителиальные опухолевые клетки с коэкспрессией цитокератинов и мезенхимального белка виментина [7, 8].

Работа выполнена в рамках программы исследований, запланированных в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (тема НИР: «Маркёры стволовой опухолевой клетки меланомы человека», рег. № АААА-А16-116122210048-6).

Конфликта интересов нет.

Дополнительной информации нет.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Trejdosiewicz L.K., Southgate J., Kemshead J.T., Hodges G.M.* // *Exp. Cell Res.* 1986. Vol. 164. N 2. P. 388.
2. *Banerjee S.S., Harris M.* // *Histopath.* 2000. Vol. 36. N 5. P. 387.
3. *Korabiowska M., Fischer G., Steinacker A., Stachura J., Cordon-Cardo C., Brinck U.* // *Anticancer Res.* 2004. Vol. 24. N 5B. P. 3203.
4. *Hendrix M.J.C., Seftor E.A., Chu Y.W., Seftor R.E.B., Nagle R.B., McDaniel K., Leong S.P.L., Yohem K.H., Leibovitz A.M., Meyskens F.L., Conaway Jr.D., Welch D.R., Liotta L.A., Stetler-Stevenson W.* // *J. Natl. Cancer Inst.* 1992. Vol. 5. N 84. P. 165 (DOI: 10.1093/jnci/84.3.165).
5. *KendaSuster N., Smrkolj S., Virant-Klun I.* // *J. Ovarian Res.* 2017. Vol. 10. N 1. P. 11 (DOI: 10.1186/s13048-017-0306-7).
6. *Davidson B., Holth A., Hellesylt E., Tan T.Z., Huang R.Y., Tropé C., Nesland J.M., Thiery J.P.* // *Hum. Pathol.* 2015. Vol. 46. N 1. P. 1 (DOI: 10.1016/j.humpath.2014.10.004).
7. *Wu D.I., Liu L., Ren C., Kong D., Zhang P., Jin X., Wang T., Zhang G.* // *Oncol. Lett.* 2016. Vol. 11. N 2. P. 1463 (DOI:10.3892/ol.2016.4092).
8. *Fuchs U., Kivelä T., Summanen P., Immonen I., Tarkkanen A.* // *Am. J. Pathol.* 1992. Vol. 141. N 1. P. 169.
9. *Богущ Т.А., Арефьева А.А., Калюжный С.А., Богущ Е.А., Тюляндин С.А., Полоцкий Б.Е., Давыдов М.М.* // *Российский биотерапевтический журнал.* 2017. Т. 16. № 4. С. 29 (DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-29-33).
10. *Богущ Т.А., Калюжный С.А., Дудко Е.А., Кирсанов В.Ю., Тюляндина А.С., Богущ Е.А., Тюляндин С.А., Давыдов М.М.* // *Вестн. Моск. ун-та Сер. 2. Химия.* 2016. Т. 57. № 5. С. 330 [*Bogush T.A., Kaliuzhny S.A., Dudko E.A., Kirsanov V.Yu.B., Tjulandina A.S., Bogush E.A., Tjulandin S.A., Davydov M.I.* // *Mosc. Univ. Chem. Bull.* 2016. Vol. 71. N 5–6. P. 307] DOI: 10.3103/S0027131416050035.

Поступила в редакцию 01.02.2019

Получена после доработки 02.03.2019

Принята к публикации 14.03.2019

COEXPRESSION OF VIMENTIN AND CYTOKERATINS IN HUMAN MELANOMA CELLS LINES

T.A. Bogush^{1*}, S.A. Kaliuzhny¹, A.A. Basharina¹, E.A. Bogush¹, V.Yu. Kirsanov², V.S. Kosorukov¹, O.S. Burova¹, M.M. Davydov², M.A. Baryshnikova¹

(¹ FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health of the Russian Federation; ² FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University); *e-mail: tatbogush@mail.ru)

Molecular heterogeneity in 7 human metastatic melanoma cells lines was revealed by dual immunofluorescent assay and flow cytometry. It has been evaluated that quite a small population of cells (up to 10%) expressed only vimentin, the main marker of melanoma. Only epithelial cytokeratins expression was revealed in more significant amount of cells (from 25% to 50%). And finally, coexpression of vimentin and cytokeratins was newly identified and dominant molecular phenotype (50–80% cells expressed both markers). The authors expect that the letter phenotype of melanoma cells may be a molecular marker of tumor aggressiveness and metastatic potential.

Key words: immunofluorescent assay, flow cytometry, vimentin, cytokeratins, melanoma.

Сведения об авторах: *Богущ Татьяна Анатольевна* – руководитель группы молекулярных маркеров опухолей лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, профессор, докт. биол. наук (tatbogush@mail.ru); *Калюжный Сергей Андреевич* – мл. науч. сотр. группы молекулярных маркеров лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (labmedchem@mail.ru); *Башарина Анна Александровна* – мл. науч. сотр. группы молекулярных маркеров лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (basharinaa@inbox.ru); *Богущ Елена Александровна* – ст. науч. сотр. хирургического отделения № 2, канд. мед. наук (labmedchem@mail.ru); *Кирсанов Владислав Юрьевич* – доцент кафедры онкологии лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, канд. мед. наук (labmedchem@mail.ru); *Косоруков Вячеслав Станиславович* – зав. лабораторией трансгенных препаратов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, канд. биол. наук (labmedchem@mail.ru); *Бурова Ольга Семёновна* – ст. науч. сотр. лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, канд. биол. наук (labmedchem@mail.ru); *Давыдов Михаил Михайлович* – зав. кафедрой онкологии лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, чл.-корр. РАН, докт. мед. наук (labmedchem@mail.ru); *Барышников Мария Анатольевна* – зав. лабораторией экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, канд. фарм. наук (labmedchem@mail.ru).