

**ПЕТРОВ**

Николай Сергеевич

**Взаимодействие p130 – белка семейства pRb,  
и  $\beta$ -катенина – передатчика сигналов Wnt, в ходе  
дифференцировки и трансформации мезенхимных  
стволовых клеток мыши**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2012

**Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки  
Институт цитологии Российской академии наук (Санкт-Петербург)**

- Научный руководитель:** кандидат медицинских наук,  
старший научный сотрудник  
**Попов Борис Валентинович**  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт цитологии РАН
- Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Поспелов Валерий Анатольевич**  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт цитологии РАН
- доктор биологических наук, профессор  
**Перевозчиков Андрей Петрович**  
Федеральное государственное бюджетное учреждение  
Научно-исследовательский институт  
экспериментальной медицины СЗО РАМН
- Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение  
Научно-исследовательский институт онкологии  
имени Н.Н. Петрова Минздравсоцразвития России

Защита состоится «22» июня 2012 года в 14 часов на заседании  
Диссертационного совета Д 002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу:  
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.  
Сайт института: <http://www.cytspb.rssi.ru>  
Адрес электронной почты института: [cellbio@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:cellbio@mail.cytspb.rssi.ru)  
Факс института: (812)297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН.

Автореферат разослан «\_\_» мая 2012 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета  
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

## Общая характеристика работы

**Актуальность проблемы.** Исследование возможности замещения клеток и тканей различных органов является актуальной задачей современной клеточной биологии в связи с увеличением продолжительности жизни, возрастанием числа геронтологических заболеваний и необходимостью восстановления органов, утративших свои функции. Мезенхимные стволовые клетки (МСК), являющиеся одним из типов соматических стволовых клеток, привлекают к себе внимание как потенциальный ресурс для регенеративной терапии благодаря относительной простоте их получения и широкому дифференцировочному потенциалу. МСК *in vivo* могут превращаться в клетки не только исходного мезодермального, но эктодермального и энтодермального происхождения. Свойство МСК приобретать необычный фенотип и несвойственные им в нормальных условиях функции – пластичность – не достаточно хорошо исследовано и является объектом изучения научных лабораторий во всем мире.

В основе пластичности МСК лежит эпигенетическое репрограммирование и трансдифференцировка МСК в клеточные линии, происходящие из различных зародышевых листков. В литературе описаны несколько моделей для изучения трансдифференцировки МСК в клетки энтодермального происхождения различной тканевой специфичности. Однако к настоящему моменту не существует модели, предоставляющей возможность для анализа внутриклеточных событий в отдельных клетках в процессе энтодермальной трансдифференцировки. Специализация СК опосредована взаимодействием молекул множества сигнальных путей. Среди них у зрелых животных ключевую роль играет сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенин. Сигналы этого пути широко используются в закладке и формировании тканей и органов в процессе эмбрионального развития. В организме зрелого животного сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенин играет ключевую роль в поддержании функций СК различных тканей, а конститутивное повышение его активности сопряжено с возникновением опухолей.

Функционирование сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин осуществляется в контексте клеточного цикла, негативным регулятором которого является семейство продукта гена ретинобластомы (pRb). Члены семейства pRb осуществляют эффекторный контроль хода клеточного цикла путем взаимодействия с транскрипционными факторами семейства E2f. В свою очередь, белки E2f регулируют синтез и активность молекул, составляющих машину клеточного цикла. При планировании настоящей работы мы основывались на хорошо известных данных о том, что p130, член семейства pRb, взаимодействует с сигнальными молекулами других регуляторных путей в контрольных точках клеточного цикла. Взаимодействие p130 с  $\beta$ -катенином – основным передатчиком в сигнальном пути Wnt/ $\beta$ -катенин, в точке R1 фазы G1 опосредовано Gsk3 $\beta$ , которая фосфорилирует как p130, так и  $\beta$ -катенин. Изучение механизма такого взаимодействия и его функциональной роли может быть важным для понимания механизма пластичности МСК и моделирования их практического использования в регенеративной терапии заболеваний человека.

### Цель и задачи исследования

Цель работы: исследовать взаимодействие  $\beta$ -катенина – передатчика сигналов Wnt, и p130 – члена семейства pRb, в ходе дифференцировки и трансформации мезенхимных стволовых клеток *in vitro*.

Задачи работы:

1. Изучить возможность индукции энтодермальной дифференцировки МСК путем их кокультивирования с клетками линии А-549, происходящими из эпителия легких, и изучить роль экспрессии гена *WNT2* в клетках А-549 в механизме индукции такой дифференцировки.
2. Охарактеризовать состояние p130 и  $\beta$ -катенина в МСК в различных фазах клеточного цикла и при активации сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин.

3. Изучить механизм формирования комплекса p130 с  $\beta$ -катенином, изменения состава комплекса в ходе клеточного цикла, при активации сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин, а также его потенциальную роль в транскрипционной регуляции генов, содержащих в промоторах сайты связывания факторов семейства LEF/TCF.
4. Оценить пролиферативную, дифференцировочную, клоногенную, адгезивную и туморогенную активность МСК, уровень ядерного  $\beta$ -катенина и транскрипционных факторов Tcf3,4 в процессе длительного пассирования МСК.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. МСК, кокультивированные с клетками линии А-549 в условиях разделения клеточно-непроницаемой мембраной, показывают активацию сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин и экспрессию легочных эпителиальных маркеров; торможение экспрессии гена *WNT2* в клетках А-549 с помощью малой интерферирующей РНК отменяет активацию  $\beta$ -катенина в кокультивируемых МСК; совместное культивирование с клетками А-549 можно рассматривать в качестве модели паракринной индукции эпителиальной дифференцировки МСК *in vitro*.
2. В асинхронно делящихся или синхронизированных в фазах G0/G1, S, и G2/M клеточного цикла МСК уровень и рисунок фосфорилирования  $\beta$ -катенина и p130 существенно не изменяются; индукция сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин ведет к активации  $\beta$ -катенина, p130 и E2f4, однако комплекс p130/E2f4 не вызывает торможения деления МСК.
3. В МСК  $\beta$ -катенин, p130 и Gsk3 $\beta$  взаимодействуют между собой и формируют комплекс, включающий в свой состав факторы E2f4, Tcf3,4, и проявляющий транскрипционную активность при экспрессии экзогенного  $\beta$ -катенина и p130.
4. В ходе длительного культивирования МСК повышается их пролиферативная, снижается дифференцировочная и адгезивная активность, на 43-47-м пассаже клетки становятся туморогенными и образуют опухоли при введении сингенным животным; приобретение туморогенности при длительном культивировании МСК сопряжено с накоплением внутриядерного  $\beta$ -катенина и транскрипционных факторов Tcf3,4.

**Научная новизна полученных результатов.** Впервые показано, что при совместном культивировании с клетками линии А-549 в условиях разделения клеточно-непроницаемой мембраной в МСК активируется сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенин и экспрессируются эпителиальные маркеры. Впервые установлено, что активация сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин в кокультивируемых МСК может вызываться фактором Wnt2, секретлируемым клетками А-549, поскольку торможение в них экспрессии гена *WNT2* с помощью стабильной продукции малой интерферирующей РНК против мРНК *WNT2* отменяет активацию  $\beta$ -катенина в МСК. Новым является то, что кокультивирование МСК и клеток линии А-549 в условиях их разделения клеточно-непроницаемой мембраной можно рассматривать в качестве модели паракринной индукции эпителиальной дифференцировки МСК. Впервые найдено, что уровень и рисунок фосфорилирования p130 в ходе клеточного цикла в МСК не изменяется в противоположность соматическим дифференцирующимся клеткам линии Т98G. Проведенный нами анализ механизма этого феномена впервые позволил выяснить, что индукция в МСК канонического сигнального пути Wnt ведет к активации его основного передатчика –  $\beta$ -катенина, а также члена семейства pRb, белка p130, и транскрипционного фактора E2f4, которые формируют комплекс p130/E2f4. Этот комплекс поддерживает некоторые линии соматических дифференцирующихся клеток в состоянии покоя, но в МСК не проявляет супрессорной активности, что, возможно, связано с включением в его состав  $\beta$ -катенина. Мы показали, что в МСК  $\beta$ -катенин и p130 физически взаимодействуют между собой, формируя с Gsk3 $\beta$  комплексы, включающие в свой состав различно фосфорилированные формы p130 и транскрипционные факторы семейства LEF/TCF – Tcf3,4. Комплексы p130-Gsk3 $\beta$ - $\beta$ -катенин-Tcf3,4 обладают транскрипционной активностью. Мы установили, что в ходе длительного культивирования значительно возрастает пролиферативная активность МСК, они утрачивают способность к дифференцировке и приобретают туморогенность, формируя опухоли при

подкожном или внутримышечном введении сингенным мышам-реципиентам. Новым в изучении механизма туморогенности является то, что ее возникновение в МСК связано с повышением уровня и накоплением в ядре клеток активных форм  $\beta$ -катенина и транскрипционных факторов Tcf3,4.

**Теоретическое и практическое значение работы.** Теоретическое значение работы заключается в разработке новой модели паракринной индукции эпителиальной дифференцировки МСК *in vitro* путем их совместном культивирования с клетками линии А-549 эпителиального происхождения в условиях разделения клеточно-непроницаемой мембраной. Важным результатом работы является получение новых доказательств взаимодействия в МСК сигнальных путей Wnt/ $\beta$ -катенин и семейства гена ретинобластомы (pRb) путем формирования комплекса p130-Gsk3 $\beta$ - $\beta$ -катенин. Мы впервые обнаружили, что комплекс p130-Gsk3 $\beta$ - $\beta$ -катенин в МСК существует в разных фазах клеточного цикла и обладает транскрипционной активностью по отношению к генам, содержащим сайты связывания белков семейства LEF/TCF. Опухолевая трансформация МСК в ходе их длительного культивирования сочетается с повышением уровня, перераспределением  $\beta$ -катенина внутри клетки и его конститутивной активацией. Практическое значение работы заключается в том, что она предоставляет возможность рассматривать комплекс p130-Gsk3 $\beta$ - $\beta$ -катенин в качестве мишени фармакологической коррекции при разработке подходов и методов регуляции поведения нормальных и опухолевых стволовых клеток в экспериментальных моделях регенеративной терапии и лечения злокачественных заболеваний. Полученные данные используются при чтении курса лекций «Введение в клеточную биологию стволовых клеток» на медицинском и биолого-почвенном факультетах Санкт-Петербургского государственного университета.

**Апробация работы.** По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ (5 статей в рецензируемых научных журналах и 5 тезисов докладов на научных конференциях). Результаты диссертации представлены на II Съезде Всероссийского общества клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2007); 4-й Российской конференции по фундаментальной онкологии (Санкт-Петербург, 2008); Всероссийской научной школе-конференции «Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования» (Москва, 2009); II Конференции молодых ученых Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2010), международной конференции «Stem Cells Update – From Basic Research to the Clinic» (Уппсала, Швеция, 2011).

**Финансовая и некоммерческая поддержка работы.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 06-04-48439, 09-04-00595), Правительства Санкт-Петербурга (грант 2.6107-06.099). Автор выражает глубокую благодарность сотрудникам ИНЦ РАН Н.Н. Никольскому, Е.Н. Толкуновой, А.Н. Томилину, В.А. Пospelову, В.В. Зенину, Г.И. Штейну, В.М. Михайлову; д-ру Чангу (LS Chang, Children's Hospital, Ohio State University, Columbus, США), д-ру Попову (N. Popov, University of Wurzburg, Germany), д-ру Прокопу (D. Prockop, Tulane University, Florida, США) за предоставленные клеточные линии, реактивы, конструкции и антитела (перечислены в разделе «Материалы и методы»), возможность использовать приборы и консультативную помощь в освоении методов.

**Вклад автора.** Автором лично проведены эксперименты, включающие культивирование клеток, анализ их пролиферативных, дифференцировочных, клоногенных и туморогенных свойств, иммунофлюоресцентное окрашивание, иммуноблоттинг, иммунопреципитацию, трансфекцию клеток, люциферазный анализ, торможение экспрессии гена WNT2 методом интерференции РНК, и обработаны экспериментальные данные. Проточно-цитометрический анализ проведен В.В. Зениным и Ю.М. Розановым, TaqMan ПЦР выполнена в компании Applied BioSystems (Foster City, Калифорния, США). Материалы, вошедшие в

представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 168 ссылок. Работа изложена на 120 страницах машинописного текста и иллюстрирована 3 таблицами и 33 рисунками.

### **Материалы и методы исследований**

**Клеточные линии и культивирование клеток.** Клеточные линии мышинных эмбриональных фибробластов C3H10T1/2 (10T1/2), мышинных миобластов C2C12, немелкоклеточной карциномы легкого человека A-549, чешуйчатой клеточной карциномы Calu-3, глиобластомы человека T98G получены из Американской коллекции клеточных культур (ATCC). Клетки эмбриональной почки человека НЕК 293Т любезно предоставлены д-ром А.Н. Томилиным (Институт цитологии РАН). В работе использованы две линии МСК мыши: одна получена ранее в нашей лаборатории, другая любезно предоставлена д-ром Д. Прокопом (D. Prockop, Tulane University, Флорида, США). Все клетки культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в газовой смеси, содержащей 95 % воздуха и 5 % CO<sub>2</sub>, при 37 °С и относительной влажности 100 % в ростовой среде (РС) DMEM, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 25 мМ Нерес, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. Для оценки *клоногенности* МСК или *клетки эксплантатов опухоли* (КОЭ) высевали по 400 и 1000 клеток в 60 мм пластиковые чашки и культивировали в стандартной РС в течение 3 недель. Выросшие колонии окрашивали красителем генциан-фиолетовым и подсчитывали визуально. *Пролиферативную активность* оценивали по времени удвоения, для определения которого МСК помещали в три ячейки 24-луночного планшета в 0.5 мл РС по  $4 \times 10^4$ /лунку. Через 48 ч число клеток подсчитывали с трипановым синим, опыт повторяли 5-7 раз. Время удвоения (D) определяли по формуле:  $D=t \times \log_{Xf/Xo} 2$ , где t – время культивирования,  $Xf/Xo$  – число клеток в конце и начале эксперимента, соответственно. *Оценку туморогенности* проводили при трансплантации МСК 12-15-го или 43-47-го пассажей сингенным мышам-реципиентам. КОЭ получали в стерильных условиях путем измельчения кусочка ткани опухоли, полученной при подкожном введении МСК сингенным мышам. Ткань опухоли помещали в РС в 100 миллиметровую культуральную чашку на 72 ч. Мигрировавшие из ткани клетки отделяли от пластика раствором трипсина и культивировали в тех же условиях, что и МСК.

**Разработка модели *in vitro* для изучения направленной дифференцировки МСК в клетки легочного эпителия.** Для индукции дифференцировки МСК в энтодермальном направлении их совместном культивировали с клетками линии А-549.  $1 \times 10^5$  клеток А-549 ресуспендировали в 1 мл РС и помещали в верхний отдел лунки 6-луночной пластины (Costar, США), отделенный от нижнего отдела покрытой коллагеном полунепроницаемой мембраной Transwell с размером пор 0.4 мкм (Corning, США) (Рис. 4). В нижний отдел той же лунки добавляли 3 мл РС и покровные стекла для микроскопии, а через 24 ч помещали  $1 \times 10^5$  МСК. Через 72-96 ч от начала кокультивирования покровные стекла с распластанными клетками использовали для иммунофлюоресцентного анализа, а клетки на пластике – для анализа экспрессии мРНК и белков. Контрольные МСК культивировали без клеток линии А-549.

Для активации β-катенина клетки инкубировали в течение 4 ч в РС, содержащей 10-20 мМ LiCl, ингибирующего Gsk3β (Stambolic et al., 1996), а фосфорилированный β-катенин определяли в них после добавления в РС на 30 мин ингибитора белковых фосфатаз – каликулина А (Sigma, США).

**Трансфекция клеток.** Клетки НЕК 293Т трансфицировали при помощи реактива 293fectin™ Transfection Reagent (Invitrogen, Великобритания) согласно протоколу производителя. Через 48 ч после трансфекции клетки использовали для анализа экспрессии рекомбинатных белков. Клетки А-549 и МСК трансфицировали при помощи электропорации (X-cell Pulser, BioRad, США).

**Метод люциферазного репортера для оценки транскрипционной активации генов, содержащих сайты связывания белков семейства LEF/TCF.** Репортерные конструкции, содержащие в регуляторной области перед минимальным промотором с-Fos 7 сайтов связывания белков семейства LEF/TCF (TOPflash) и кодирующую последовательность гена люциферазы, соответствующую контрольную конструкцию с мутацией сайтов связывания LEF/TCF (FOPflash) (Korinek et al., 1997); экспрессионный вектор, кодирующий  $\beta$ -катенин с мутацией Ser33Ala; плазмиды, содержащие гены *p130* и  $\beta$ -галактозидазы, вводили в МСК или клетки 293Т в различных комбинациях, позволяющих выявить трансактивирующую роль  $\beta$ -катенина и транссупрессирующую роль *p130*. Активность люциферазы определяли по интенсивности свечения после добавления к клеточным экстрактам реактива Glo-lisis (Promega, США). Для нормализации количества люциферазы в разных пробах использовали активность  $\beta$ -галактозидазы.

**Анализ экспрессии мРНК.** Анализ экспрессии мРНК при помощи TaqMan ПЦР в реальном времени был выполнен в Applied BioSystems (Foster City, Калифорния, США). Для этого исследования готовили по 4 отдельные пробы контрольных МСК и МСК, кокультивированных с клетками А-549 в течение 72 ч. Была исследована экспрессия следующих мышечных генов: *цитокератинов 5, 8, 14, 18 и 19; ZO-1 (Zonula Occludens-1), pro-SP-c* (сурфактант-ассоциированный белок С), *HOXC4, CD45, CD31, актина, GAPDH*.

**Получение РНК, электрофорез РНК в денатурирующем геле и ее количественная оценка.** РНК получали из осадков клеток, лизированных в гуанидинтиоцианатном буфере (Chomczynski, Sacchi 1987), пробы РНК подвергали электрофорезу в денатурирующем геле с формальдегидом. После электрофореза РНК в геле визуализировали по свечению полос 18S и 28S, окрашенных бромистым этидием. Выравнивание количества РНК в различных пробах производили после определения интенсивности полосы 28S на соответствующих дорожках с помощью программного продукта TotalLab Quant.

**Синтез кДНК на матрице РНК и амплификация фрагментов генов с помощью ревертированной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).** Синтез кДНК проводили, используя тотальную РНК, праймер олиго-дТ18 и обратную транскриптазу; ПЦР-амплификацию выполняли на циклере PCR Script (Hybade, Великобритания) при температурном режиме, одинаковом для обеих пар праймеров к *WNT2*. Праймеры были синтезированы в компании «Бигль» (Россия, Санкт-Петербург) (Таблица 1).

**Таблица 1**

**Последовательности праймеров для амплификации кДНК гена WNT2 и ингибирования его экспрессии**

Ген	Прямой праймер (5' – 3')	Обратный праймер (5' – 3')	Размер
<i>WNT2-1</i>	<i>GCCCCTCTCGGTGGAATCTGGCTC</i>	<i>GCTGTGATCCCTGTCCAGGGTGT</i>	279 п.о.
<i>WNT2-2</i>	<i>CATGGTGATACATGAGAGCTAC</i>	<i>GCTGTGATCCCTGTCCAGGGTGT</i>	209 п.о.
<i>GAPDH</i>	<i>GAGTCAACGGATTTGGTCGT</i>	<i>TTGATTTGGAGGGATCTCG</i>	238 п.о.
<i>WNT2-si1</i>	<i>GCAAAGGAAAGGAAAGGAA</i>		19 нт
<i>WNT2-si2</i>	<i>GATCCAAAGAAGATGGGAA</i>		19 нт
<i>WNT2-siK</i>	<i>CATAAGCTGAGATACTTCA</i>		19 нт

**Ингибирование экспрессии гена WNT2 с помощью метода интерференции РНК.** Торможение экспрессии *WNT2* в клетках А-549 воспроизводили в соответствии с методом, описанным Брюммелькамп и др. (Brummelkamp et al., 2002), используя вектор pSUPER компании OligoEngine (США). Этот вектор содержит промотор Н1, распознаваемый РНК-полимеразой III, и позволяет экспрессировать транскрипты siRNA в форме последовательностей, которые вводят в вектор. 60-мерные олигонуклеотиды, содержащие последовательности размером 19 оснований, комплементарные мРНК *WNT2* (Таблица 1), вставленные дважды в обратной ориентации, последовательность-шпильку в середине олигонуклеотида, и липкие концы для лигирования в сайт BglIII вектора на 5' конце и сайт

XhoI – на 3' конце кодирующей последовательности, были синтезированы в компании Sigma (Германия) и клонированы в векторе pSUPER.retro.puro. Клетки A-549 трансфицировали полученными векторами и подвергали пурамициновой селекции (1.5 мкг/мл, 3 сут). Для контроля эффективности трансфекции и селекции клетки были котрансфицированы вектором, экспрессирующим Gfp. Эффективность подавления экспрессии гена WNT2 в трансфицированных клетках A-549 оценивали при помощи ОТ-ПЦР. Полученные клетки использовали для кокультивирования с МСК.

**Синхронизация клеток в различных фазах клеточного цикла и проточная цитометрия.** МСК синхронизировали в фазе G0/G1, культивируя в течение 48 ч в РС, содержащей 0.15 % ФБС. Для синхронизации в фазе S МСК выращивали 24 ч в РС с 5 мМ тимидина с последующей их отмывкой и культивированием в течение 5 ч в нормальной РС. Для синхронизации в фазах G2/M использовали последовательную обработку клеток тимидином и нокодазолом и рестимуляцию нормальной РС (Петров и др., 2011). Клетки линии T98G синхронизировали при помощи культивирования в течение 72 ч в РС с 0.1 % ФБС и рестимуляции нормальной РС; в опытах использовали клетки, собранные через 0, 6, 12, 18, 24 и 30 ч после рестимуляции, как описано ранее (Popov et al., 2005). Для анализа распределения клеток по фазам клеточного цикла клетки окрашивали йодистым пропидием и анализировали на проточном цитометре ATC 1000 (Brucker, Germany).

**Иммуноцитохимические методы.** Клетки, выращенные на покровных стеклах, окрашивали на внутриклеточные белки специфическими антителами и конъюгированными с флюоресцентной меткой видоспецифическими антителами. Ядра клеток окрашивали DAPI. Препараты анализировали на конфокальных сканирующих микроскопах LSM 5 Pascal или Leica TCS SP5, используя лазеры с длиной волны 405, 488, 543 и 633 нм.

**Электрофорез и иммуоблотинг.** Разделение белков производили при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по стандартному протоколу. Белки переносили из геля на мембрану PVDF (Amersham, США) при помощи полусухого электропереноса и выявляли первыми антигенспецифическими и вторыми видоспецифическими антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, методом хемилюминесценции.

**Фракционирование клеточных экстрактов** производили при помощи лизиса клеток в гипотоническом буфере, как описано ранее (Popov et al., 2005; Petrov et al., 2011).

**Иммунопреципитация.** Для преципитации белков клеточные осадки лизировали при 0 °С 30 мин в буферном растворе, содержащем 50 мМ Hepes pH 7.5, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 2.5 мМ ЭГТА, 10 % глицерина, 0.1 % Твин-20 и ингибиторы протеаз и фосфатаз (Sigma, США) в разведении 1:100. Затем клетки подвергали обработке ультразвуком на соникаторе. Клеточные экстракты, содержащие 500 мкг общего белка, обрабатывали специфическими кроличьими антителами, антителами к иммуноглобулинам кролика и протеин-G сефарозой. Преципитаты отмывали, кипятили в буфере для нанесения на гель, центрифугировали для отделения от сефарозы и анализировали путем электрофореза в полиакриламидном геле.

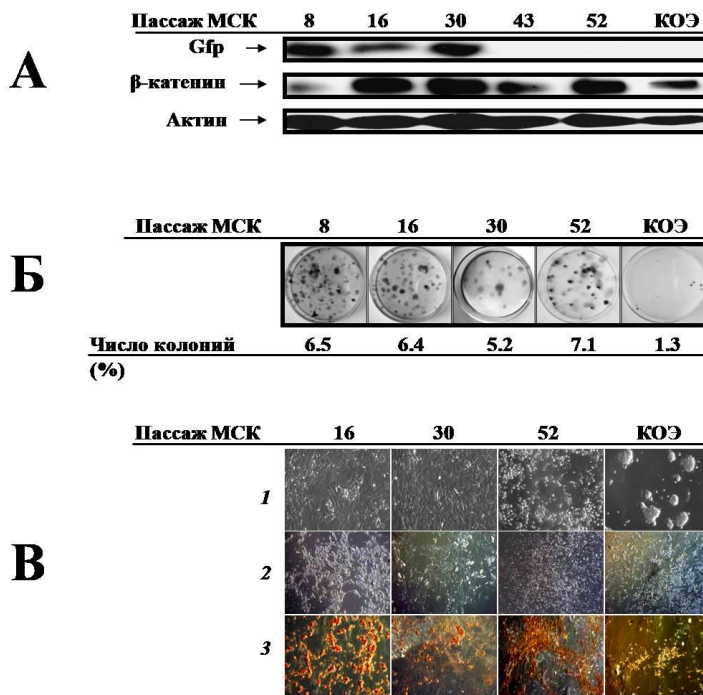
**Статистический анализ.** Статистическая обработка результатов была проведена преимущественно с использованием средней арифметической величины, стандартного отклонения и критерия Стьюдента (при  $p=0.05$ ), программы Microsoft® Office Excel 2003. Опыты с иммуоблотингом и иммунофлюоресцентным окрашиванием, результаты которых в соответствии с международной практикой не подвергали статистическому анализу, повторяли 3-5 раз. В некоторых случаях для количественной оценки и сравнения содержания белков в полосах на репликах электрофореграмм применяли программу TotalLab ([www.totallab.com](http://www.totallab.com)).

## Результаты и обсуждение

**Характеристика первичной культуры МСК, полученной из костного мозга трансгенных мышей GFP.** Полученные нами МСК (МСКс) и подобные клетки (МСКт), любезно предоставленные доктором Д. Прокопом (Dr. D. Prockop, Tulane University, США), были охарактеризованы по экспрессии *in vitro* тканеспецифических маркеров и способности к

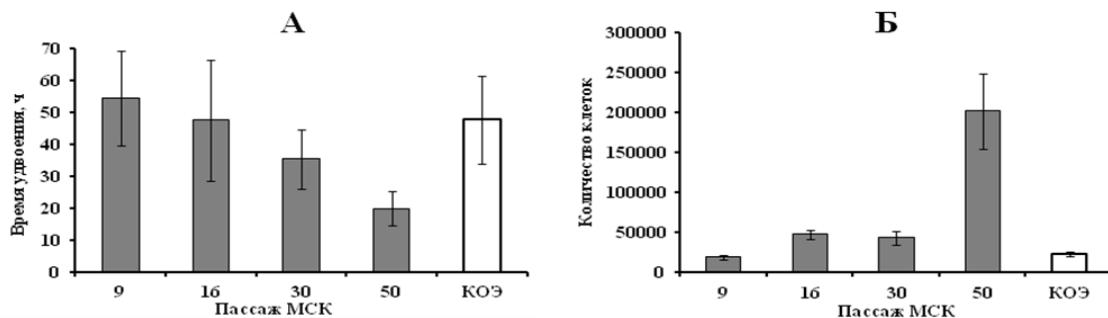


дифференцировке в различные тканеспецифические клетки мезодермального происхождения (жировые, костные, мышечные). МСКс, подобно контрольным клеткам МСКт, продуцируют мезенхимальные маркеры CD29, CD44, CD49f, CD105, Gfr, актин и виментин, но не цитokerатины или кроветворный маркер CD45 (Рис. 1 и не показано). При культивировании в остеогенной, адипогенной или миогенной ростовой среде МСК накапливают кальциевые преципитаты, жировые вакуоли или десмин – тканеспецифические маркеры соответствующих линий. Полученные результаты показали, что клетки, выделенные нами из костного мозга трансгенных мышей, соответствуют критериям Международного общества по клеточной терапии, разработанным для характеристики МСК.



**Рисунок 1.** Экспрессия Gfr, клоногенные, адгезивные и дифференцировочные свойства МСК в ходе их пассирования в культуре. **А** – оценка экспрессии Gfr и β-катенина в МСК в ходе их пассирования *in vitro*. **Б** – клоногенность МСК различных пассажей. **В** – адгезивные и дифференцировочные свойства МСК в ходе их культивирования. 1 – адгезивные свойства МСК, индуцированных к адипогенной дифференцировке, оценивали как способность расплываться на пластике на следующий день после добавления в культуру клеток дифференцировочной среды; 2-3 – МСК, индуцированные к адипогенной дифференцировке через 3 недели после начала опыта; 2 – фазово-контрастное изображение получено при суправитальной съемке клеток на микроскопе Zeiss Axiovert 40; 3 – изображение получено после фиксации и окраски клеток красителем масляным красным. Об. 10×.

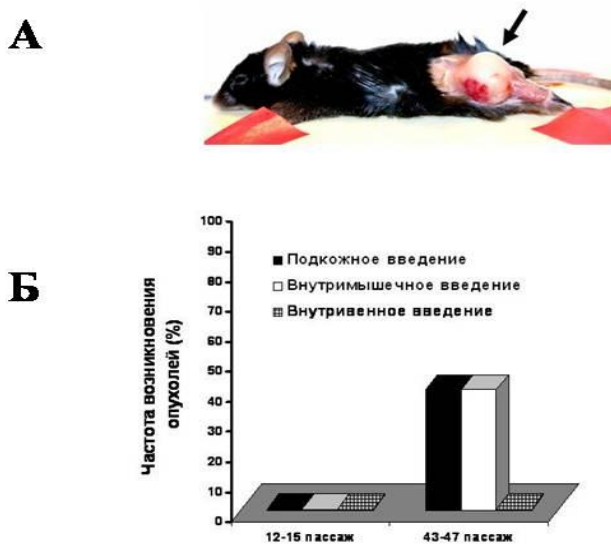
**Характеристика свойств МСК в ходе их длительного пассирования в культуре.** До 25-го пассажа МСК сохраняют параллельную осевую ориентацию и монослойный характер роста даже при предельном насыщении. МСК 43-47-го пассажей показывают значительно более высокую плотность насыщения, в условиях которой соседние клетки ориентированы хаотически по отношению друг к другу, что часто проявляется в перекрестном расположении и частичном наложении соседних клеток друг на друга. Насыщающая плотность роста МСК от 9 к 16-му пассажу увеличивается в 2 раза, а к 52-му пассажу – в 10 раз (Рис. 2Б). Начиная с 43-го пассажа, МСК показывают значительное снижение экспрессии Gfr, тогда как уровень продукции общеклеточного β-катенина на поздних пассажах не изменяется (Рис. 1А). МСК поздних пассажей и КОЭ теряют экспрессию Gfr и способность к адипогенной



**Рисунок 2.** Характеристика пролиферативной активности МСК и КОЭ в процессе пассирования в культуре. **А** – время удвоения МСК различных пассажей и клеток эксплантатов опухоли, полученной из МСК. **Б** – характеристика насыщающей плотности роста МСК и КОЭ. Вертикальные линии представляют стандартное отклонение.

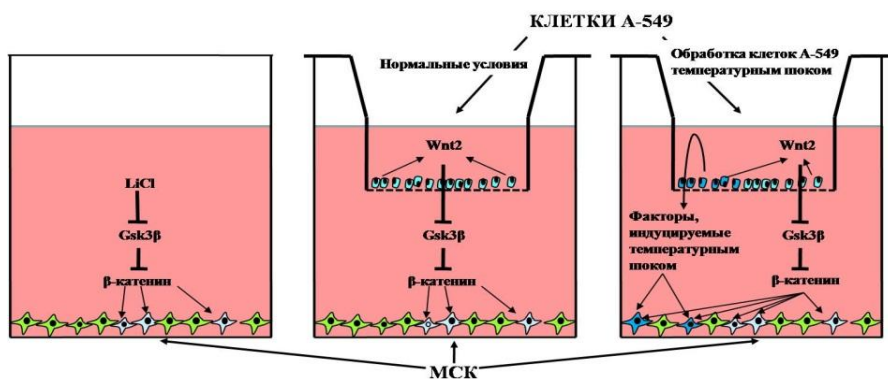
дифференцировке (Рис. 1А, В). Уменьшение способности прикрепляться к пластиковой поверхности очевидно в МСК 52-го пассажа, индуцированных к адипогенной дифференцировке (Рис. 1В, 1). Клоногенная активность МСК различных пассажей составляет 5-7 % и в ходе пассирования существенно не изменяется (Рис. 1Б). Скорость деления МСК увеличивается почти в три раза, при оценке с помощью времени удвоения, которое на 9-м пассаже составляет 54.4 ч и сокращается до 19.8 ч к 52-му пассажу (Рис. 2А). На 43–44-м пассаже МСК приобретают туморогенную активность. При подкожном, внутримышечном или внутривенном введении МСК 12–15-го пассажей нормальным сингенным мышам-самкам линии C57BL не наблюдается возникновения опухолей, в тех же условиях у 40 % животных, которым подкожно или внутримышечно вводили МСК 43–47 пассажей, опухоли клеток возникают в течение 1–2 нед после инъекции клеток (Рис. 3А, Б). При внутривенном введении МСК любых использованных нами пассажей макроскопически видимые опухоли не возникают даже при наблюдении в течение 3 мес после введения клеток.

**Характеристика клеток эксплантатов опухоли (КОЭ), полученной из МСК.** КОЭ по многим свойствам не отличаются от МСК поздних пассажей. Они не экспрессируют Gfr, показывают снижение адгезивности и дифференцировочного потенциала. Клоногенная активность КОЭ снижена по сравнению с таковой МСК в 4-5 раз (Рис.1).



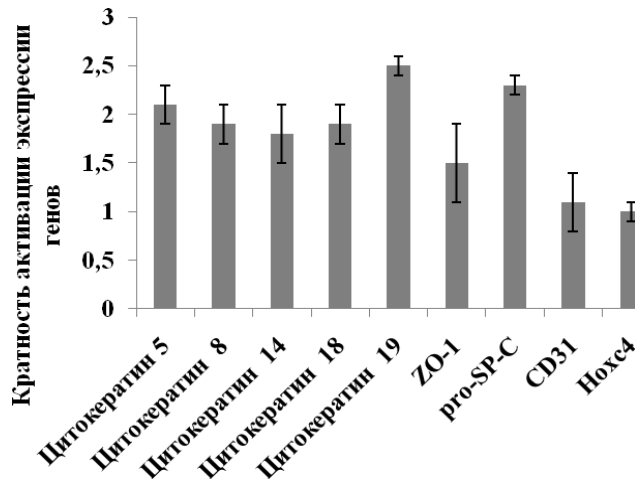
**Рисунок 3.** Оценка туморогенности МСК в ходе их культивирования путем введения клеток различных пассажей сингенным животным. А – внешний вид опухоли, возникшей при внутримышечном введении МСК 44-го пассажа сингенной мыши линии C57BL.  $5 \times 10^5$  МСК 44-го пассажа инъецировали в мышцу бедра, опухоль обнаружили через 1 нед после введения клеток, а через 8 нед она имела в диаметре 2 см и весила более 2 г. Б – частота возникновения опухолей при введении МСК ранних (12–15) и поздних (43–47) пассажей нормальным сингенным реципиентам. При подкожном и внутримышечном введении использовали  $5 \times 10^5$  клеток в 50-100 мкл среды, при внутривенном введении –  $5 \times 10^6$  клеток в 0.5 мл среды. МСК вводили 5 мышам каждой группы с последующим наблюдением до 3 мес

**Разработка модели энтодермальной дифференцировки МСК в опытах in vitro.** Для оценки способности МСК дифференцироваться в энтодермальном направлении их культивировали с клетками А-549 в условиях разделения клеточно-непроницаемой мембраной (Рис. 4). Клетки линии А-549 происходят из эпителия легких и секретируют повышенные количества белка Wnt2, который аутокринно поддерживает их пролиферацию. Соматический нокаут гена WNT2



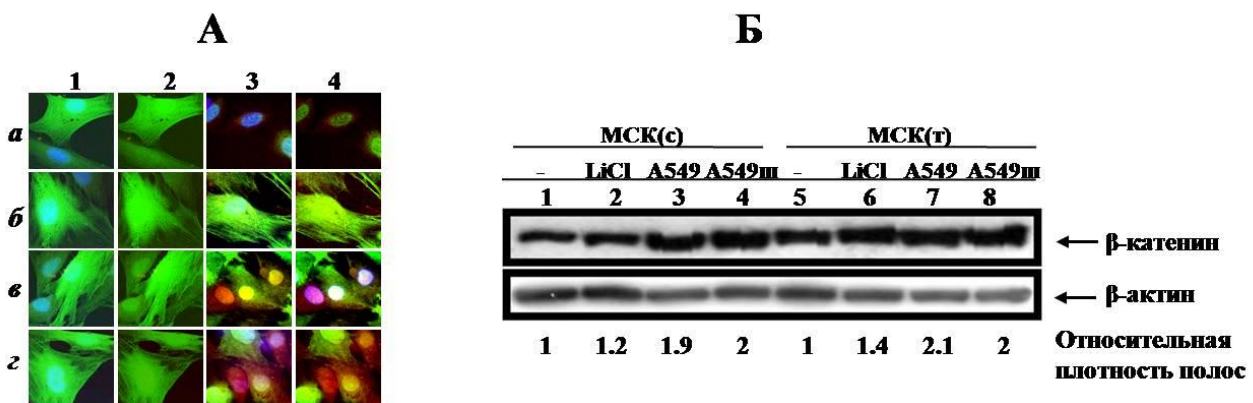
**Рисунок 4.** Схема модели трансдифференцировки МСК в энтодермальном направлении.

приводит к остановке пролиферации и активации апоптоза в этих клетках (You et al., 2004). Поскольку Wnt2 секретируется во внешнюю среду, мы предположили, что при совместном культивировании клеток А-549 и МСК он может проникать через мембрану, связывать специфические рецепторы на поверхности МСК и активировать сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенин. Кокультивирование вызывает в МСК экспрессию мРНК *цитокератинов 5, 8, 14, 18, 19; ZO-1, pro-SP-C*. Результаты ОТ-ПЦР показывают, что экспрессия мРНК *цитокератинов* и *ZO-1* увеличивается в 2 раза, а *pro-SP-C* (маркер альвеолярных эпителиальных клеток типа II) – в 2.3 раза (Рис. 5). Увеличение экспрессии цитокератинов подтверждается при иммунофлюоресцентной окраске МСК антителами к панцитокератину (не показано).

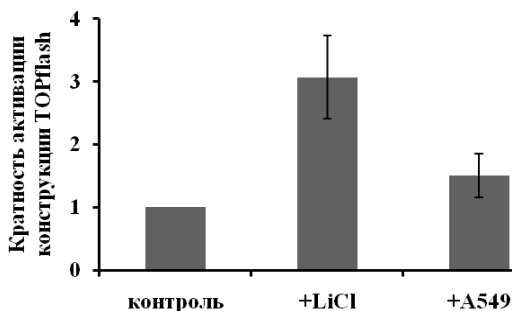


**Рисунок 5.** Кокультивирование с клетками А-549 вызывает в МСК экспрессию маркеров легочной эпителиальной дифференцировки. Результаты анализа экспрессии генов в МСК с помощью количественной ОТ-ПЦР, представлены среднее значение увеличения количества мРНК и стандартное отклонение.

**Кокультивирование с клетками А-549 вызывает в МСК активацию  $\beta$ -катенина.** Кокультивирование с клетками А-549 в течение 72 ч вызывает в МСК активацию  $\beta$ -катенина, которая при иммунофлюоресцентном окрашивании проявляется в повышении его цитоплазматического уровня и транслокации в ядро, подобно таковой при обработке клеток ионами лития (Рис. 6А, *в3,4* и *б3,4*, соответственно). Обработка клеток А-549 температурным шоком существенно не влияет на их способность активировать  $\beta$ -катенин в кокультивируемых МСК (Рис. 6А, *з3,4*). В иммуноблоттинге МСКс, полученные нами, и контрольные МСКт (Рис. 6Б, дорожки 5-8) также показывают увеличение количества  $\beta$ -катенина в указанных выше условиях. Интересно, что повышение уровня  $\beta$ -катенина в МСК при их кокультивировании или обработке ионами лития сопровождается увеличением его электрофоретической подвижности



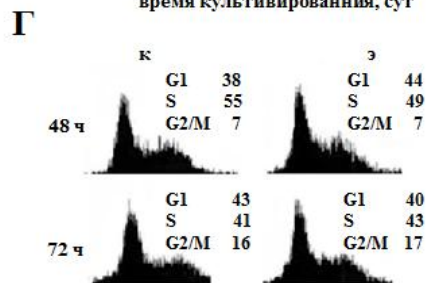
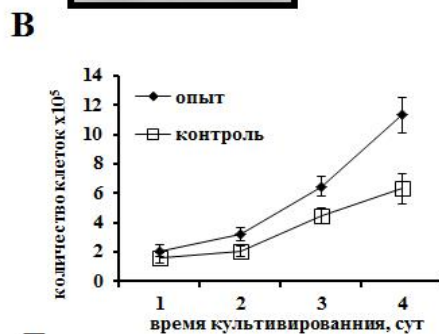
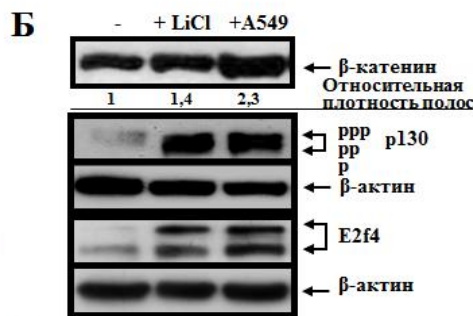
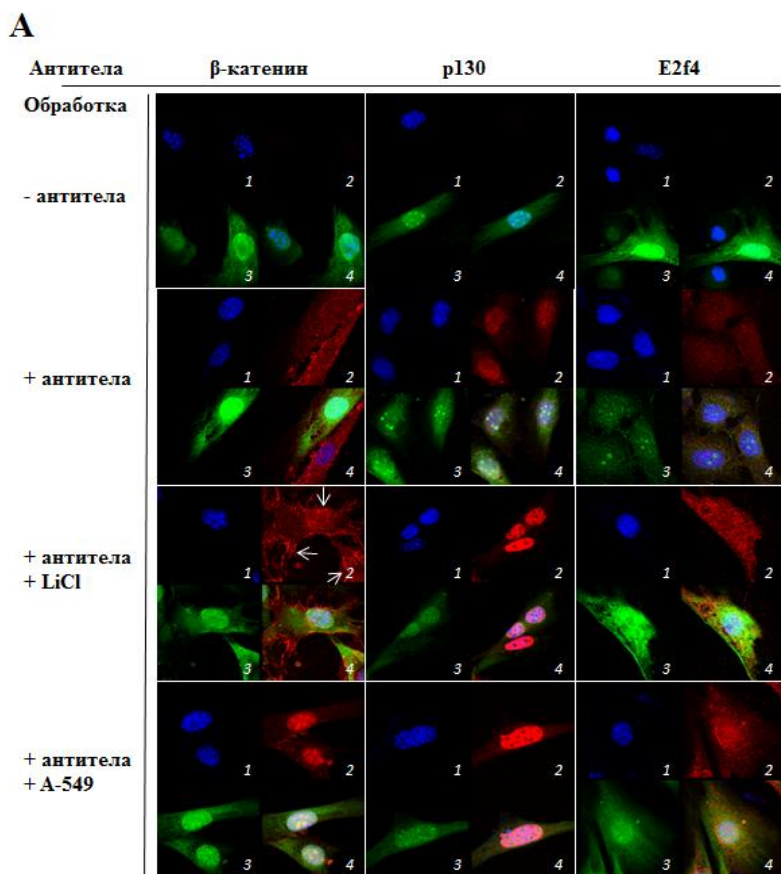
**Рисунок 6.** Кокультивирование с клетками А-549 вызывает в МСК активацию  $\beta$ -катенина. А – иммунофлюоресцентный анализ активации  $\beta$ -катенина в МСК, кокультивированных с клетками А-549 в течение 72 ч (*а* – без обработки, *б* – обработка 20 мМ LiCl в течение 24 ч, *в* – кокультивирование с необработанными клетками А-549, *з* – кокультивирование с клетками А-549, обработанными температурным шоком; 1-2 – без первых антител, 3-4 – окраска антителами к  $\beta$ -катенину). Б – оценка с помощью иммуноблоттинга активации  $\beta$ -катенина в МСК после краткосрочного кокультивирования с клетками А-549. МСКс и МСКт кокультивировали с клетками А-549 в течение 96 ч. LiCl добавляли в среду в концентрации 20 мМ на 24 ч. А-549 – необработанные клетки, А549ш – клетки, подвергнутые температурному шоку.



**Рисунок 7.** Кокультивирование МСК с клетками А-549 или культивирование в среде, содержащей LiCl, вызывает трансактивацию репортерной конструкции, содержащей сайты связывания белков LEF/TCF. МСК, временно трансфицированные репортерными конструкциями TOPflash/FOPflash, культивировали в течение 4 ч в среде с 10 мМ LiCl или кокультивировали с клетками А-549 в течение 72 ч.

(Рис. 6Б, дорожки 2-4 и 1, соответственно), что, вероятно, является важной характеристикой активации  $\beta$ -катенина. Функциональным следствием индукции сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин как при обработке МСК ионами лития, так и при их кокультивировании с клетками линии А-549 является активация репортерной конструкции TOPflash, содержащей сайты связывания белков семейства LEF/TCF, взаимодействующих с  $\beta$ -катенином (Рис. 7).

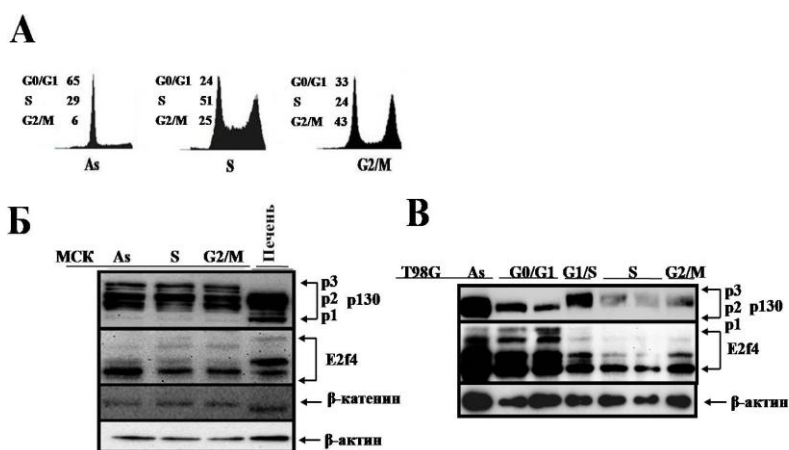
**Оценка состояния  $\beta$ -катенина, p130 и E2f4 в МСК с индуцированным сигнальным путем Wnt/ $\beta$ -катенин.** Иммунофлюоресцентный анализ показывает, что в нормальных условиях МСК продуцируют небольшое количество E2f4, который распределяется равномерно между



**Рисунок 8.** Индукция сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин в МСК ведет к активации p130 и E2f4. А – иммунофлюоресцентный анализ экспрессии p130,  $\beta$ -катенина и E2f4 в МСК, кокультивированных с клетками линии А-549. 1 – DAPI, 2 – специфические антитела, 3 – естественная зеленая флюоресценция, 4 – комбинированное изображение. Б – оценка с помощью иммуноблотинга активации p130 и E2f4 в МСК после индукции сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин. МСК кокультивировали в течение 96 ч с клетками А-549. LiCl добавляли в ростовую среду в концентрации 10 мМ на 4 ч. В – пролиферативная активность МСК, кокультивированных с клетками А-549. Данные представляют собой среднюю величину  $\pm$  стандартное отклонение. Г. Цитометрическая характеристика МСК, кокультивированных с клетками А-549; к – контроль, э – эксперимент.

цитоплазмой и ядром, тогда как p130 локализуется преимущественно в ядре (Рис. 8А). Обработка хлористым литием или кокультивирование с клетками А-549 вызывает накопление β-катенина, p130, E2f4 в цитоплазме и их транслокацию в ядро. При использовании иммуноблотинга мы также обнаружили повышение уровня и активацию всех трех названных белков (Рис. 8Б). Белки p130 и E2f4 в первичных культурах и некоторых линиях трансформированных клеток, например в клетках глиобластомы человека Т98G, формируют комплекс, тормозящий транскрипцию множества генов, продукты которых необходимы для прогрессии клеточного цикла (Moberg et al., 1996; Popov et al., 2005). Проведенный нами анализ кривых роста показывает, что скорость деления МСК, кокультивированных с клетками А-549, не уменьшается (Рис. 8В). Цитометрическая оценка пролиферативного статуса кокультивированных МСК свидетельствует, что как в опыте, так и в контроле МСК находятся в стадии активной пролиферации (Рис. 8Г). На основании этих данных мы предположили, что в МСК комплекс p130/E2f4 включает β-катенин, что модифицирует его способность супрессировать активность генов, продукты которых необходимы для перехода G1/S и дальнейшего хода клеточного цикла. По данным литературы, дифференцировка одних клеток, например, миобластов и нейробластов, требует предварительной остановки их пролиферации, тогда как лимфоциты и МСК, приобретающие свойства гепатоцитов, активно делятся в ходе дифференцировки (Sprent et al., 2008; Herencia et al., 2011).

**Синхронизация МСК в различных фазах клеточного цикла.** Сравнительная характеристика уровня и рисунка фосфорилирования p130, E2f4 и β-катенина в асинхронных и синхронизированных в различных фазах клеточного цикла МСК показала, что в этих клетках p130 присутствует во всех трех фосфорилированных формах в каждой фазе клеточного цикла (Рис. 9А). Наоборот, в гепатоцитах мыши и покоящихся клетках линии Т98G (Рис. 9Б) p130 находится только в гипофосфорилированных формах, тогда как гиперфосфорилированная форма p3 появляется в клетках Т98G только в переходе G1/S, за чем следует снижение общего уровня p130. Подобным образом в МСК изменяется количество E2f4 и β-катенина, которые показывают небольшие колебания уровня и рисунка фосфорилирования в ходе клеточного цикла (Рис. 9А) в противоположность мышинным гепатоцитам и клеткам линии Т98G. В последних в состоянии покоя присутствуют гипофосфорилированные формы p130 и гиперфосфорилированные формы E2f4. В противоположность МСК, в ходе клеточного цикла в клетках Т98G E2f4 теряет свои активные гиперфосфорилированные формы (Рис. 9В).

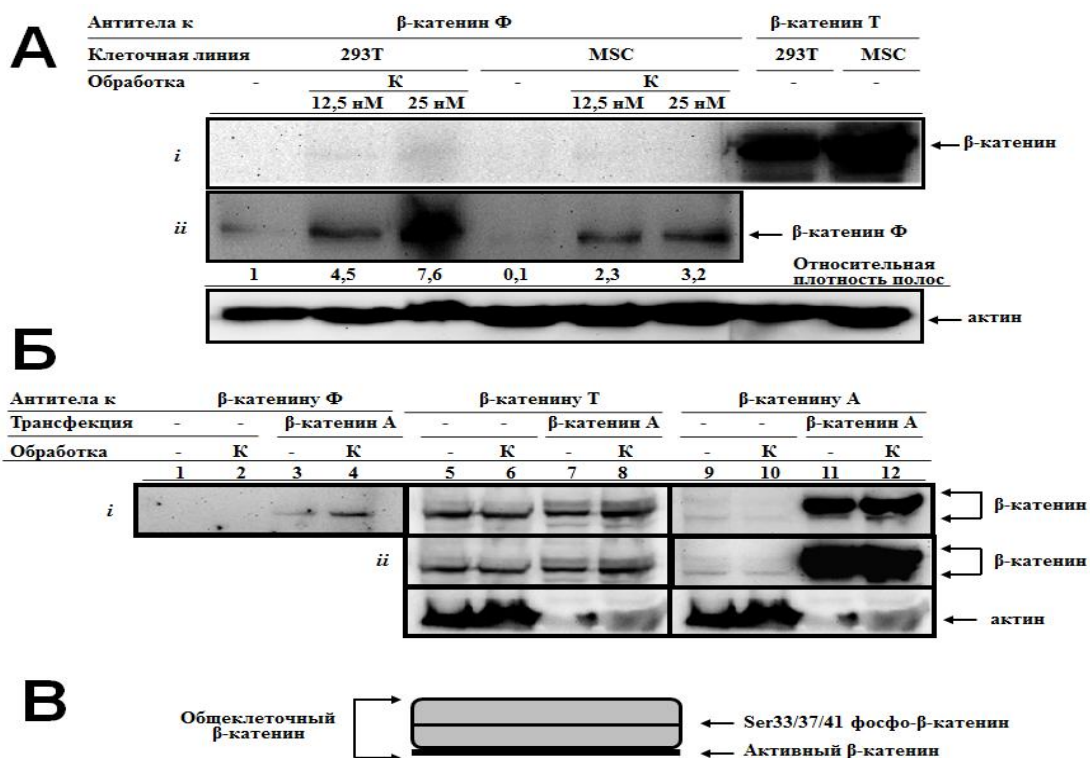


**Рисунок 9.** Сравнительная характеристика уровня и рисунка фосфорилирования p130, E2f4 и β-катенина в синхронизированных и асинхронно растущих МСК с помощью иммуноблотинга. **А** – МСК, синхронизированные в фазах S и G2/M клеточного цикла с помощью тимидина и нокодазола; As – асинхронно делящиеся клетки; S, G2/M – клетки, синхронизированные, соответственно, в фазе S и G2/M; p1, p2, p3 – формы p130, отличающиеся по электрофоретической подвижности; **Б-В** – изменение уровня и рисунка фосфорилирования p130, E2f4 и β-катенина в синхронизированных МСК и контрольных клетках линии Т98G.

Полученные нами результаты свидетельствуют о существенных особенностях изменения уровня и активности p130, E2f4 и β-катенина в МСК при индукции дифференцировки, связанной с активацией сигнального пути Wnt/β-катенин, а также в ходе клеточного цикла. Эти

изменения отличаются от таковых в клетках линии T98G. Поскольку p130 и  $\beta$ -катенин являются субстратами одной и той же киназы Gsk3 $\beta$ , мы в последующих опытах проверяли гипотезу о том, что эти белки могут формировать комплекс, важный для регуляции функций МСК.

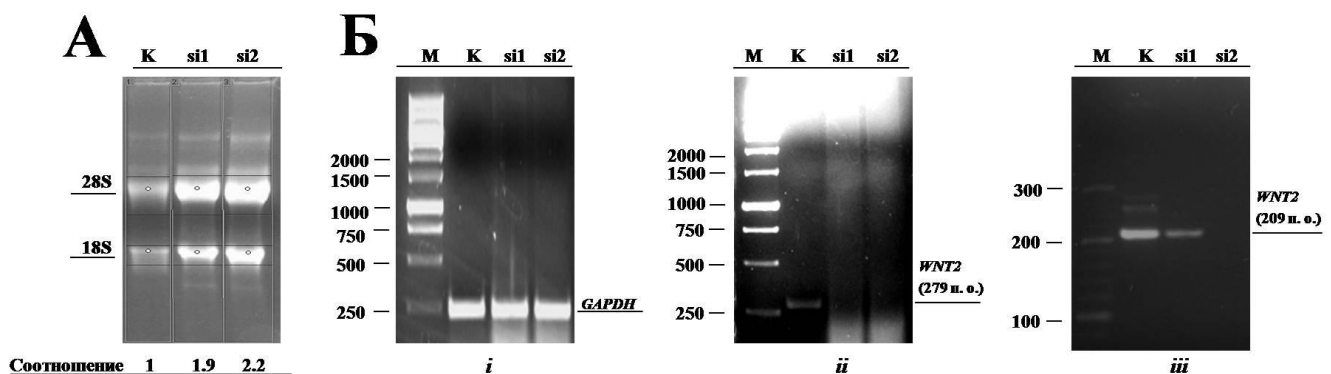
**Оценка продукции и электрофоретической подвижности неактивного и активного  $\beta$ -катенина до и после индукции в МСК сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин.** Для выявления соответствия между уровнем, электрофоретической подвижностью и рисунком фосфорилирования различных форм  $\beta$ -катенина мы использовали антитела, распознающие общеклеточный, неактивный – фосфорилированный по Ser33/37/Thr41, или активный – нефосфорилированный по Ser37/Thr41  $\beta$ -катенин. Известно, что антитела к активному белку распознают  $\beta$ -катенин, непосредственно передающий сигналы Wnt внутрь клетки (Staal et al., 2002). Клетки почки человека линии 293Т использовали в качестве положительного контроля продукции фосфо- $\beta$ -катенина в соответствии с рекомендацией производителя этих антител компании Cell Signaling, Inc. (США). Клетки обрабатывали ингибитором фосфатаз каликулином А (Sigma) для предотвращения дефосфорилирования  $\beta$ -катенина, т.к., по данным компании Cell Signaling, Inc., в нормальных условиях фосфорилированный по Ser33/37/Thr41 белок в большинстве клеточных линий не выявляется или выявляется в очень небольших количествах. Полученные нами результаты показывают, что нормальные асинхронно делящиеся МСК и клетки линии 293Т содержат едва определяемое количество



**Рисунок 10.** Характеристика с помощью иммуноблотинга продукции и электрофоретической подвижности общеклеточного, фосфорилированного и активного  $\beta$ -катенина. **А** – оценка продукции фосфо- $\beta$ -катенина в МСК и клетках линии 293Т. Асинхронно растущие МСК и клетки линии 293Т культивировали 30 мин в среде с каликулином, клеточные экстракты подвергали электрофорезу и иммуноблотингу для визуализации фосфо- $\beta$ -катенина. **Б** – оценка соответствия уровня и электрофоретической подвижности общеклеточного, фосфо- и активного  $\beta$ -катенина в клетках линии 293Т. Клетки линии 293Т, нетрансфицированные (дорожки 1-2, 5-6, 9-10) или трансфицированные плазмидой, экспрессирующей стабилизированный  $\beta$ -катенин с мутацией Ser33Ala (дорожки 3-4, 7-8, 11-12), были обработаны каликулином (К) и охарактеризованы по экспрессии фосфо- ( $\beta$ -катенин Ф), общеклеточного ( $\beta$ -катенин Т) и активного  $\beta$ -катенина ( $\beta$ -катенин А); *i* и *ii*, соответственно, кратковременная и длительная обработка электрофоретических реплик реагентом, активирующим хемилюминесценцию (ECL). **В** – схема соответствия между электрофоретической подвижностью общеклеточного, фосфо- и активного  $\beta$ -катенина.

фосфорилированного  $\beta$ -катенина, присутствие которого становится очевидным в МСК только при длительной обработке электрофоретических реплик реагентом, активирующим хемилюминесценцию (ECL) (Рис. 10А, *ii*). Антитела к фосфо- $\beta$ -катенину не определяют этот белок (Рис. 10Б, дорожки 1-2) при уровне сигнала, достаточном для выявления высокого уровня общеклеточного  $\beta$ -катенина антителами, распознающими его С-концевой участок (Рис. 10Б, дорожки 5-6). В этих условиях антитела к активному  $\beta$ -катенину связывают в необработанных МСК незначительное количество белка, который движется в полосе с большей электрофоретической подвижностью (Рис. 10Б, дорожки 9-10) относительно мажорной полосы, определяемой в клетках, трансфицированных плазмидой, содержащей ген  $\beta$ -катенина с мутацией Ser33Ala (Рис. 10Б, дорожки 11-12). Обработка трансфицированных клеток каликулином сопровождается увеличением уровня фосфо- $\beta$ -катенина, определяемого антителами к общему белку (Рис. 10Б, дорожки 7-8), что подтверждается при оценке уровня фосфорилированного по Ser33/37/Thr41 белка, выявляемого специфическими антителами к фосфо- $\beta$ -катенину (Рис. 10Б, дорожка 3-4). Необработанные клетки, по всей видимости, содержат незначительное количество активного  $\beta$ -катенина, уровень которого понижается после их обработки каликулином (Рис. 10Б, дорожки 9-10). Электрофоретически фосфо- и общеклеточный  $\beta$ -катенин характеризуются одинаковой подвижностью, тогда как активный нефосфорилированный по остаткам Ser37/Thr41  $\beta$ -катенин движется немного быстрее, и содержащая его полоса при электрофорезе совпадает с нижней частью полосы, включающей общеклеточный  $\beta$ -катенин (Рис. 10В).

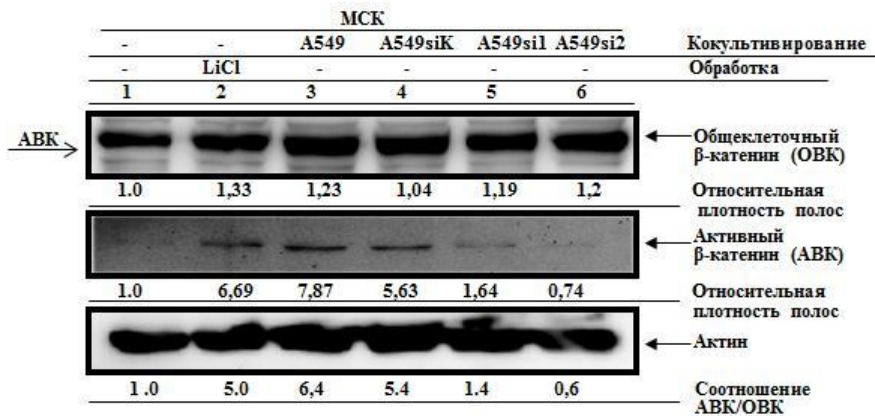
**Изучение механизма индукции сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин в МСК при их совместном культивировании с клетками линии А-549.** Для изучения механизма индукции в МСК, кокультивируемых с клетками А-549, сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин мы получили стабильные клоны клеток А-549, в которых экспрессия *WNT2* была ингибирована с помощью системы pSUPER RNAi (Рис. 11). Стабильная экспрессия в клетках А-549 векторов, продуцирующих малую интерферирующую РНК против мРНК *WNT2* (si1 и si2), вызывает, соответственно, уменьшение или отмену экспрессии этого гена (Рис. 11Б, *ii, iii*).



**Рисунок 11.** Торможение экспрессии гена *WNT2* в клетках линии А-549, выполненное с помощью системы pSUPER RNAi (OligoEngine, США). А – электрофорез РНК в денатурирующем геле. Тотальная РНК в клетках А-549, трансфицированных плазмидами, содержащими вектор pSUPER с контрольным олигонуклеотидом (к) или олигонуклеотидами, распознающими специфические последовательности в мРНК гена *WNT2* человека (si1, si2). Трансфицированные клетки были селектированы в течение 3 сут с помощью пурамицина с последующей экстракцией тотальной РНК, ее электрофорезом в денатурирующем геле и определением относительного количества РНК в разных пробах для их выравнивания при последующем получении кДНК. Б – оценка эффективности торможения экспрессии гена *WNT2* с помощью ОТ-ПЦР. *i, ii, iii* – электрофорез ДНК в 1% (*i, ii*) и 3%-ной (*iii*) агарозе для характеристики продуктов ПЦР-амплификации, соответственно, контрольного гена *GAPDH*; фрагментов гена *WNT2* размером 279 п. о. и 209 п. о. (М – маркеры молекулярной массы, п. о. – пары оснований).

Для выяснения механизма активации  $\beta$ -катенина мы использовали линии А-549 с нормальным или пониженным уровнем экспрессии гена *WNT2* и затем с помощью иммуноблотинга оценивали состояние  $\beta$ -катенина в МСК (Рис. 12). Результаты этих опытов

показали, что контрольные необработанные МСК продуцируют  $\beta$ -катенин, который выявляется при иммуноблоттинге в форме мажорной и минорной полос, соответственно, с меньшей и большей электрофоретической подвижностью (Рис. 12, дорожка 1). При обработке МСК ионами лития антитела к общеклеточному  $\beta$ -катенину в иммуноблоттинге выявляют увеличение количества общеклеточного и активного белка (Рис. 12, дорожка 2). При кокультивировании МСК с нормальными или трансфицированными вектором pSUPER с контрольным олигонуклеотидом клетками А-549 уровень общеклеточного  $\beta$ -катенина возрастает незначительно, но заметно увеличивается его электрофоретическая подвижность и количество активного белка (Рис. 12, дорожки 3-4, соответственно). Электрофоретическая подвижность активного  $\beta$ -катенина соответствует нижней части мажорной полосы, в которой движется общеклеточный белок (Рис. 12, стрелка АВК).



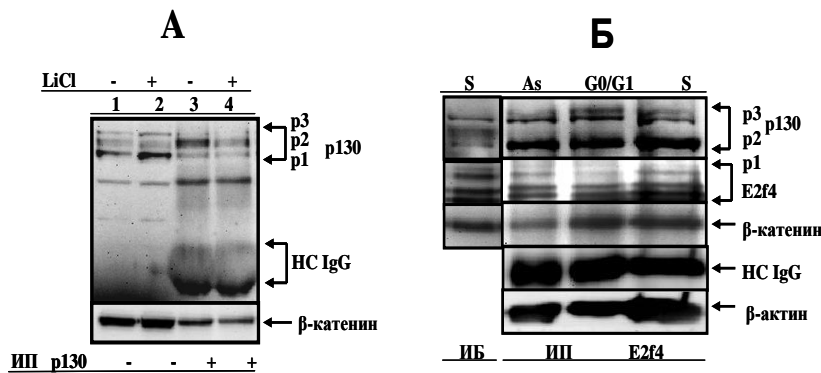
**Рисунок 12.** Оценка экспрессии активной и общеклеточной фракции  $\beta$ -катенина в МСК, кокультивированных с клетками линии А-549 с различным уровнем продукции *WNT2*, путем иммуноблоттинга. Клетки линии А-549 со стабильной экспрессией вектора pSUPER, содержащего комплементарную (si1, si2) или некомплементарную (siK) siРНК против мРНК гена *WNT2*, контрольные необработанные клетки линии А-549 кокультивировали с МСК 10-го

пассажа в течение 72 ч. МСК, обработанные LiCl, использовали в качестве положительного контроля. После кокультивирования экстракты МСК подвергали электрофорезу и иммуноблоттингу, электрофоретические реплики окрашивали антителами к активной или общей фракции  $\beta$ -катенина. АВК – активный  $\beta$ -катенин, ОВК – общий  $\beta$ -катенин, стрелкой «АВК» показано положение активного  $\beta$ -катенина относительно общеклеточного белка при электрофорезе, остальные сокращения – те же, что и на Рис. 11.

Определение относительного содержания  $\beta$ -катенина на разных дорожках показало, что эта величина возрастает в МСК при обработке клеток ионами лития и кокультивировании с нормальными или трансфицированными контрольным вектором (siK) клетками линии А-549. Соотношение АВК/ОВК, по нашим представлениям, более объективно характеризует активацию  $\beta$ -катенина, чем уровень общеклеточного белка. Использование этого соотношения также показывает, что подавление экспрессии гена *WNT2* в клетках А-549 отменяет активацию  $\beta$ -катенина в кокультивированных МСК (Рис. 12). Наши данные свидетельствуют, что в основе механизма активации сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин в МСК, кокультивированных с клетками А-549, лежит секреция последними фактора Wnt2, который паракринно вызывает в МСК активацию  $\beta$ -катенина. Результаты этого и предшествующих опытов показывают, что активация сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин проявляется не столько в увеличении уровня общеклеточного белка, сколько в ускорении его электрофоретической подвижности, связанной с продукцией активного  $\beta$ -катенина, электрофоретическая подвижность которого совпадает с таковой нижней части полосы общеклеточного белка. С другой стороны, уровень активного  $\beta$ -катенина, выявляемого специфическими антителами к нефосфорилированному по остаткам Ser37/Thr41 белку, является наиболее убедительным показателем активации сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин (Staal et al., 2002).

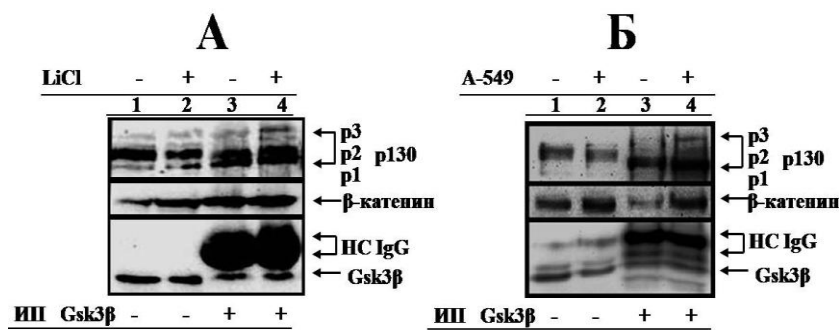
**В МСК p130 и  $\beta$ -катенин физически взаимодействуют между собой в комплексе с Gsk3 $\beta$ .** В преципитатах из экстрактов МСК, полученных с помощью антител к p130, выявляется  $\beta$ -катенин (Рис. 13А). Антитела против E2f4 копреципитируют из экстрактов МСК не только p130, но и  $\beta$ -катенин (Рис. 13Б), а антитела к  $\beta$ -катенину – p130 (не показано). Физическое





**Рисунок 13.** p130 и  $\beta$ -катенин физически взаимодействуют между собой в МСК. **А** –  $\beta$ -катенин копреципитируется антителами к p130; НС Ig – тяжелые цепи иммуноглобулинов кролика, ИП – иммунопреципитация; **Б** – p130 и  $\beta$ -катенин копреципитируются вместе с E2f4. ИБ – иммунооблотинг.

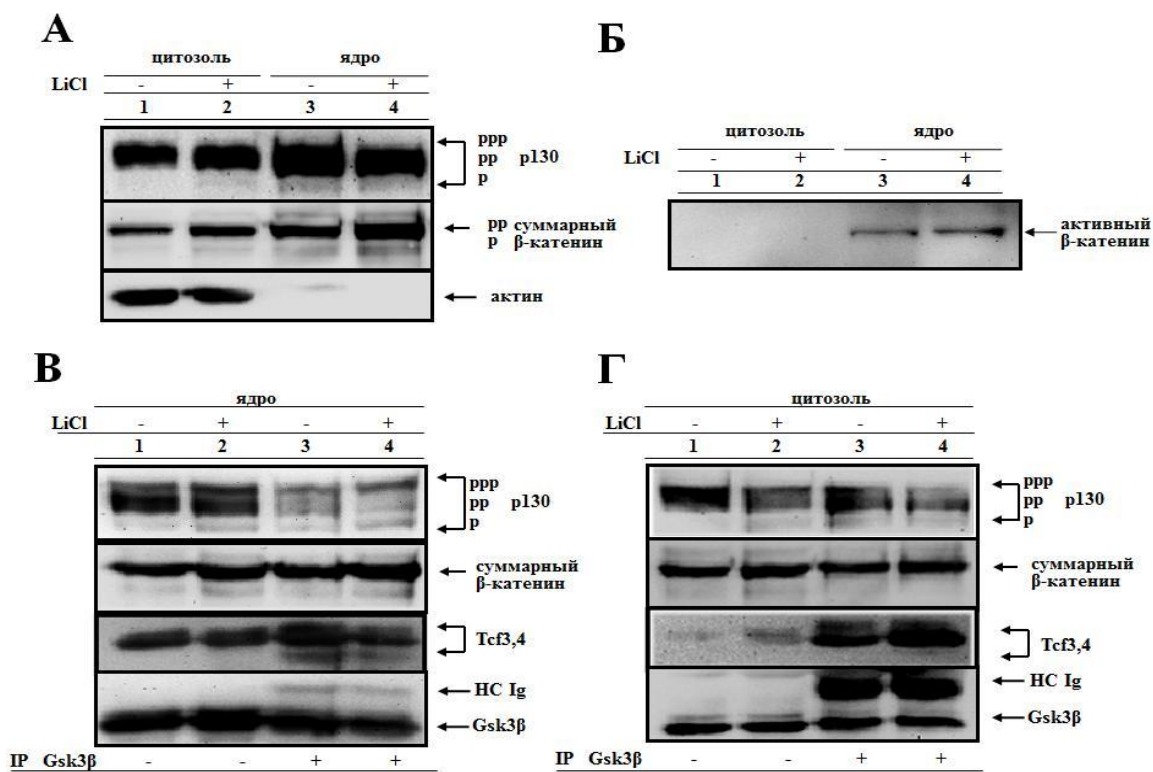
взаимодействие p130 с  $\beta$ -катенином и E2f4 определяется в различных фазах клеточного цикла (Рис. 13Б). Известно, что в фазах G0/G1 p130 фосфорилируется Gsk3 $\beta$ , одной из основных мишеней которой является  $\beta$ -катенин (Litovchick et al., 2004). Преципитация с использованием антител к Gsk3 $\beta$  подтверждает описанные выше результаты, свидетельствующие, что p130 и  $\beta$ -катенин входят в состав одного и того же комплекса, образование которого происходит с участием Gsk3 $\beta$  (Рис. 14А). Антитела к Gsk3 $\beta$  копреципитируют как  $\beta$ -катенин, так и p130 (Рис. 14А). Комплекс p130-Gsk3 $\beta$ - $\beta$ -катенин формируется в асинхронных и синхронизированных в разных фазах клеточного цикла МСК, причем его характеристики в ходе клеточного цикла существенно не изменяются (Рис. 13Б). Характер фосфорилирования p130, преципитированного из экстрактов МСК в различных фазах клеточного цикла, подобен – эти преципитаты содержат как гипер-, так и гипофосфорилированные формы белка (Рис. 14Б), тогда как в контрольных клетках линии T98G антитела к E2f4 копреципитируют из экстрактов покоящихся клеток только гипофосфорилированные формы p130 (результаты не показаны). Стимуляция ионами лития сопровождается повышением в МСК уровня  $\beta$ -катенина, что сочетается с увеличением количества p130, его гипофосфорилированных форм, и выявляется в иммуноблотинге и иммунопреципитации (Рис. 14А, соответственно, дорожки 1-2 и 3-4). Повышение уровня и активация p130 в МСК отмечается также при другом способе индукции сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин – кокультивировании МСК с клетками линии А-549 (Рис. 14Б). Структурные компоненты комплекса p130/E2f4-Gsk3 $\beta$ - $\beta$ -катенин, выявляемые при преципитации различными антителами, существенно различаются. Антитела к p130 преципитируют p2 и p3 p130 (Рис. 13А), антитела к E2f4 – p1 и p3 (Рис. 13Б), антитела к  $\beta$ -катенину – p2 (результаты не показаны), а антитела к Gsk3 $\beta$  – все три формы белка (Рис. 14А, Б). Эти данные свидетельствуют о существовании в МСК различных комплексов, содержащих p130 и  $\beta$ -катенин, которые могут играть различную функциональную роль.



**Рисунок 14.** p130, Gsk3 $\beta$  и  $\beta$ -катенин формируют комплекс в МСК. **А** – антитела к Gsk3 $\beta$  преципитируют  $\beta$ -катенин и p130 из экстрактов МСК. **Б** – оценка физического взаимодействия между Gsk3 $\beta$ , p130 и  $\beta$ -катенином в МСК, кокультивированных с клетками А-549. Экстракты МСК, необработанных, обработанных ионами лития или кокультивированных с клетками линии А-549,

преципитировали антителами к Gsk3 $\beta$ , а преципитированные белки выявляли в иммуноблотинге. ИП – иммунопреципитация, НС IgG – тяжелая цепь иммуноглобулинов G.

**Оценка формирования комплекса p130-Gsk3 $\beta$ - $\beta$ -катенин в ядерном и цитоплазматическом компартментах МСК.** Определение p130 и  $\beta$ -катенина в экстрактах МСК из цитозоля и ядра показало, что эти белки локализуются преимущественно в ядерном компартменте клетки и находятся там в активных формах (Рис. 15А). Обработка МСК ионами лития способствует

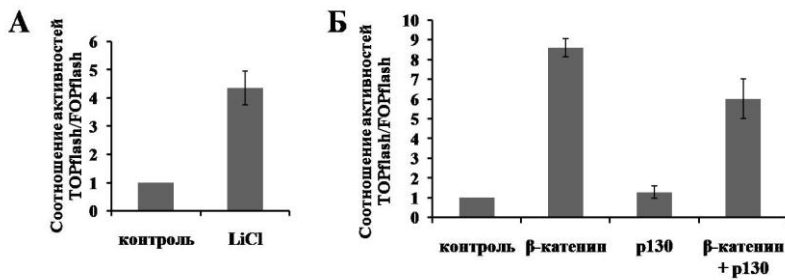


**Рисунок 15.** Оценка состава комплекса p130-Gsk3β-β-катенин в ядерном и цитоплазматическом компартментах МСК. **А** – характеристика p130 и β-катенина в цитоплазматическом и ядерном компартментах МСК, обработанных LiCl, с помощью иммуноблотинга. Асинхронно растущие МСК культивировали в течение 4 ч в ростовой среде с 10 мМ LiCl, клеточные экстракты разделяли на цитозольную и ядерную фракции, белки визуализировали с помощью иммуноблотинга, как это описано в разделе «Материалы и методы». **Б** – определение активной фракции β-катенина в цитоплазматическом и ядерном компартментах МСК. Реплику электрофореграммы (Рис. 15А) обрабатывали антителами к активному β-катенину. **В** – характеристика p130 и β-катенина, копреципитированных из ядерных экстрактов МСК антителами к Gsk3β. **Г.** Оценка комплекса p130-Gsk3β-β-катенин в цитозольной фракции МСК, необработанных или обработанных LiCl.

повышению уровня общеклеточного и активного β-катенина в ядре (Рис.15А, Б, дорожки 3-4). Результаты иммунопреципитации показывают, что в ядре присутствуют все три фосфорилированные формы p130, в цитозоле – преимущественно форма p2 (Рис. 15В, Г, дорожки 1-2). Обработка LiCl увеличивает количество форм p1 и p3 p130 в преципитатах из ядерных, но не из цитозольных экстрактов (Рис. 15В, Г, дорожки 3-4). Эти данные позволяют сделать предположение о роли Gsk3β в фосфорилировании p130 и формировании ее функциональных комплексов с p130 и β-катенином. Вероятно, Gsk3β способствует физическому взаимодействию β-катенина с p130, но фосфорилирование p130 этой киназой носит не функциональный характер, а приводит к формированию неактивной формы p2, которая локализуется преимущественно в цитозоле. Комплекс p130-Gsk3β-β-катенин в ядре содержит активные формы p130 и β-катенина и, вероятно, способствует их взаимному привлечению к регуляторным областям генов-мишеней, что может играть важную роль в регуляции функций МСК. Антитела к Tcf3,4 обнаруживают их в иммуноблотинге в ядерных, но не цитозольных экстрактах МСК (Рис. 15В, Г, дорожки 1,2). В условиях иммунопреципитации антитела к Gsk3β выявляют Tcf3,4 как в ядре, так и в цитозоле (Рис. 15В, Г, дорожки 3-4).

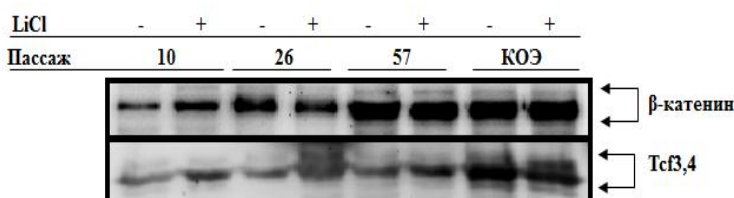
**Оценка транскрипционной активности p130 с помощью репортерных конструкций, содержащих сайты связывания белков LEF/TCF.** Присутствие в комплексе p130-Gsk3β-β-катенин транскрипционных факторов Tcf3,4 давало основание предположить, что этот комплекс способен физически взаимодействовать с регуляторными областями генов-мишеней Wnt/β-катенин, содержащих сайты связывания транскрипционных факторов семейства

LEF/TCF. С целью проверки этого предположения мы трансфицировали клетки линии 293Т экспрессионными векторами, содержащими люциферазные репортерные конструкции с сайтами связывания белков LEF/TCF. При обработке клеток ионами лития отмечается 4-кратная активация репортерной конструкции TOPflash (Рис. 16А). Экспрессия в клетках 293Т  $\beta$ -катенина, нечувствительного к фосфорилированию и инактивации Gsk3 $\beta$  вследствие мутации Ser33Ala, приводит к транскрипционной активации TOPflash. Дополнительная экспрессия в клетках экзогенного p130 уменьшает уровень транскрипционной активации, вызванной введением вектора, содержащего ген  $\beta$ -катенина.



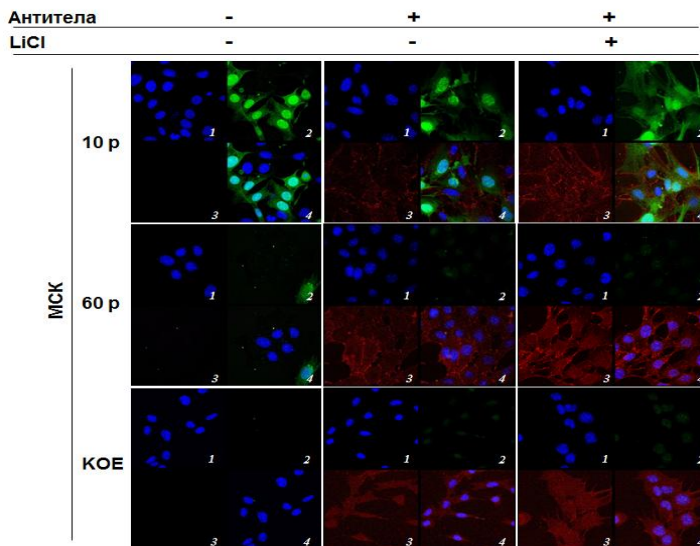
**Рисунок 16.** p130 супрессирует вызванную  $\beta$ -катенином транскрипционную активацию репортерной конструкции, содержащей сайты связывания LEF/TCF. А – обработка ионами лития повышает транскрипционную активность репортера TOPflash в клетках линии 293Т. Б –  $\beta$ -катенин вызывает транскрипционную активацию репортера TOPflash, а p130 уменьшает уровень этой активации.

**Сравнительная оценка уровня и рисунка фосфорилирования  $\beta$ -катенина и Tcf3,4 в МСК в процессе их длительного культивирования.** Наши предшествующие опыты показали, что уровень суммарного  $\beta$ -катенина в МСК в ходе длительного пассирования, а также в КОЭ не изменяется. Для более точной оценки роли  $\beta$ -катенина в процессе злокачественной трансформации МСК в ходе их длительного пассирования мы произвели сравнительный анализ количества и рисунка фосфорилирования  $\beta$ -катенина и Tcf3,4 в ядерной фракции МСК ранних и поздних пассажей до и после стимуляции клеток ионами лития. Эти эксперименты выявили повышение уровня обоих белков в ядерной фракции МСК, что сочеталось со снижением чувствительности клеток к действию ионов лития (Рис. 17). Если в клетках 10-го пассажа происходит заметное повышение уровня ядерного  $\beta$ -катенина после их стимуляции ионами лития, то в клетках 57-го пассажа и КОЭ возрастание уровня белка регистрируется в необработанных клетках. Существенно, что увеличение количества общеклеточного  $\beta$ -катенина происходит за счет электрофоретически более подвижной нижней части содержащей его полосы, соответствующей положению активного белка (Рис. 17). Уровень ядерного Tcf3,4, выявляемого в МСК с помощью иммуноблотинга, в ходе пассирования повышается не так значительно, как таковой  $\beta$ -катенина, но резко возрастает в КОЭ. При обработке ионами лития уровень Tcf3,4 в ядерной фракции МСК всех исследованных пассажей заметно повышается. В клетках 57-го пассажа при обработке ионами лития повышение уровня Tcf3,4 более выражено, чем таковое  $\beta$ -катенина (Рис. 17).



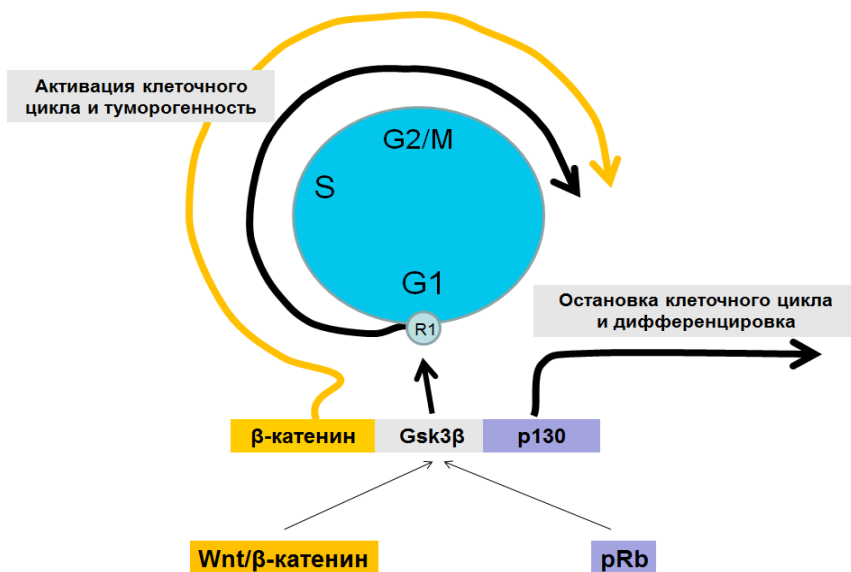
**Рисунок 17.** Характеристика  $\beta$ -катенина и Tcf3,4 в ядерной фракции МСК в ходе их длительного культивирования. Ядерные экстракты клеток подвергали электрофорезу и иммуноблотингу, как это описано в разделе «Материалы и методы». КОЭ – клетки эксплантатов опухоли, полученной из МСК 43-47-го пассажей.

**Иммунофлюоресцентная оценка уровня и активации  $\beta$ -катенина в МСК.** С целью подтверждения результатов о повышении уровня и активации  $\beta$ -катенина в ходе длительного пассирования МСК был использован иммунофлюоресцентный анализ (Рис. 18). МСК 10-го пассажа в обычных условиях экспрессируют высокий уровень Gfr, но низкий уровень  $\beta$ -катенина, продукция которого повышается во всех компартментах клеток: цитоплазме, ядре и цитоплазматической мембране после добавления в РС хлористого лития (Рис. 18). По мере



**Рисунок 18.** Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии и локализации  $\beta$ -катенина в МСК разных пассажей и КОЭ при обработке клеток ионами лития. Экспоненциально растущие МСК культивировали в среде с 10 мМ LiCl и окрашивали антителами к  $\beta$ -катенину. 1 – окраска DAPI, 2 – естественная зеленая флуоресценция, 3 –  $\beta$ -катенин, 4 – совмещенное изображение. Красную флуоресценцию выявляли вторыми антителами, конъюгированными с Cy5® 633. Об. 100 $\times$ .

пассирования уровень  $\beta$ -катенина в ядерных экстрактах необработанных МСК значительно повышается. МСК 60-го пассажа реагируют на добавление LiCl в ростовую среду незначительным повышением уровня  $\beta$ -катенина во всех отделах клетки. КОЭ, как и МСК поздних пассажей, не экспрессируют Gfp, а уровень  $\beta$ -катенина и его внутриклеточное распределение в ответ на обработку клеток ионами лития схожи с таковыми в МСК поздних пассажей (Рис. 18). В отличие от них в КОЭ не выявляется мембранный  $\beta$ -катенин и не наблюдается его перераспределение между разными компартментами при обработке ионами лития (Рис. 18). Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о взаимодействии сигнальных путей Wnt/ $\beta$ -катенин и pRb в регуляции деления, пролиферации и трансформации МСК. В нормальных условиях в МСК ранних пассажей сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенин может играть важную роль в сопряжении клеточного цикла и дифференцировки, как необходимого компонента механизма самоподдержания СК. В ходе длительного пассирования в МСК происходит увеличение уровня внутриядерного  $\beta$ -катенина и его конститутивная активация, что может являться реакцией на стресс, например, повышенную оксигенацию в культуре, и способствует преодолению остановки клеточного цикла и клеточного старения. «Платой» за спасение от клеточного старения является иммортализация и последующая трансформация МСК, в механизме возникновения которой важную роль может играть конститутивная транскрипционная активация генов-мишеней семейства LEF/TCF, например гена *c-MYC*. Схематично взаимодействие сигнальных путей Wnt/ $\beta$ -катенин и pRb в нормальных и трансформированных МСК можно представить в виде схемы на Рис. 19.



**Рисунок 19.** Сигнальные пути Wnt/ $\beta$ -катенин и pRb взаимодействуют в ходе клеточного цикла, что опосредовано образованием комплекса p130- $\beta$ -катенин-Gsk3 $\beta$ . В этом комплексе p130 является потенциальным супрессором мишеней  $\beta$ -катенина, его активность направлена на остановку клеточного цикла и дифференцировку МСК. Действие  $\beta$ -катенина, напротив, активирует прогрессию клеточного цикла и при конститутивной активации способствует возникновению туморогенности.

## Выводы

1. При кокультивировании с клетками линии А-549, происходящими из эпителия легких, в условиях разделения клеточно-непроницаемой мембраной в МСК активируется сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенин, что сопряжено с приобретением белками p130 и E2f4 активного состояния и экспрессией маркеров легочного эпителия; торможение в клетках А-549 экспрессии гена *WNT2* с помощью метода интерференции РНК отменяет в кокультивируемых МСК активацию  $\beta$ -катенина.
2. В МСК в ходе клеточного цикла не происходит существенных изменений уровня и рисунка фосфорилирования белков p130 и E2f4, которые в контрольных клетках линии Т98G формируют супрессорный комплекс, тормозящий выход из состояния покоя; диссоциация этого комплекса за счет фосфорилирования и деградации p130 является обязательным условием прогрессии клеточного цикла в клетках Т98G, но не происходит в МСК.
3. В МСК  $\beta$ -катенин, p130, Gsk3 $\beta$  и E2f4 формируют в различных фазах клеточного цикла комплекс, состав которого в ядре и цитозоле различается и изменяется при активации сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин; в состав этого комплекса входят факторы Tcf3,4, опосредующие его транскрипционную активность, что выявляется при экспрессии экзогенного  $\beta$ -катенина или  $\beta$ -катенина вместе с p130.
4. В ходе длительного культивирования МСК происходит повышение скорости их пролиферации, понижаются дифференцировочная и адгезивная активность, на 43-47-м пассажах клетки образуют опухоли при введении сингенным животным. Приобретение туморогенности МСК в ходе их длительного пассирования сочетается с повышением уровня ядерного  $\beta$ -катенина, транскрипционных факторов Tcf3,4 и снижением чувствительности клеток к действию ионов лития, что соответствует состоянию конститутивной активности сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин в МСК поздних пассажей и КОЭ.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Popov V.V., Serikov V.B., **Petrov N.S.**, Izusova T.V., Gupta N., Matthay A. 2007. Lung epithelial cells induce epithelial differentiation in mouse mesenchymal bone marrow stem cells by paracrine mechanism. *Tissue Engineering*. 13(10): 2445-2450.
2. Гринчук Т.М., Иванцов К.М., Алексеенко Л.Л., Кожухарова И.В., Зайчик А.М., Михайлов В.М., **Петров Н.С.**, Попов Б.В. 2008. Характеристика культуры мезенхимных стволовых клеток мыши, экспрессирующих GFP. *Цитология*. 50(12): 1029-1034.
3. Попов Б.В., **Петров Н.С.**, Михайлов В.М., Томилин А.Н., Алексеенко Л.Л., Гринчук Т.М., Зайчик А.М. 2009. Спонтанная трансформация и иммортализация мезенхимных стволовых клеток в культуре in vitro. *Цитология*. 51(2): 91-102.
4. **Петров Н.С.**, Жидкова О.В., Зенин В.В., Попов Б.В. 2011. Негативный регулятор клеточного цикла – белок p130 и  $\beta$ -катенин формируют комплекс в мезенхимных стволовых клетках. *Цитология*. 53(2): 107-115.
5. **Petrov N.**, Zhidkova O., Serikov V., Zenin V., Popov B. 2012. Induction of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in mouse mesenchymal stem cells is associated with activation of the p130 and E2f4 and formation of the p130/Gsk3 $\beta$ / $\beta$ -catenin complex. *Stem Cells Dev*. 21(4): 587-597.
6. **Петров Н.С.**, Злобина О.В., Сериков В.Б., Зайчик А.М., Комяков Б.К., Гулиев Б.Г., Алексеев М.Ю., Попов Б.В. 2007. Сравнительная характеристика изменений уровня и рисунка фосфорилирования  $\beta$ -катенина, белка p130 и транскрипционного фактора E2F4 в мезенхимных стволовых клетках при их кокультивировании с клетками линии А-549. Тезисы докладов II Съезда Общества клеточной биологии совместно с Юбилейной конференцией, посвященной 50-летию Института цитологии РАН. *Цитология*. 49(9): 782.
7. Попов Б.В., Гринчук Т.М., Иванцов К.М., **Петров Н.С.**, Злобина О.В., Алексеенко Л.Л., Скрипкина Н.С., Каминская Е.В., Кузоватов С.Н., Михайлов В.М. 2008. Опухолевая

- трансформация мезенхимальных стволовых клеток костного мозга мышей C57BL/6, экспрессирующих белок GFP. Тезисы 4-й Российской конференции по фундаментальной онкологии. Вопросы онкологии. 54(2): 22.
8. **Петров Н.С.**, Жидкова О.В., Сериков В.Б., Попов Б.В. 2009.  $\beta$ -катенин, p130 и E2F4 формируют функциональный комплекс в мезенхимальных стволовых клетках. Материалы Всероссийской научной школы-конференции «Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования». 48.
  9. **Петров Н.С.**, Жидкова О.В., Попов Б.В. 2010.  $\beta$ -катенин и GSK3 $\beta$  формируют в мезенхимных стволовых клетках комплексы, включающие различные формы p130. Тезисы докладов и сообщений, представленные на II Конференцию молодых ученых Института цитологии РАН. Цитология. 52(6): 501-502.
  10. **Petrov N.**, Zhidkova O., Zenin V., Popov B. 2011. Induction of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in mouse mesenchymal stem cells is associated with activation of p130 and E2f4 and transformation of the p130/Gsk3 $\beta$ / $\beta$ -catenin complex. Abstracts of «Stem Cells Update – From Basic Research to the Clinic». 50.

### Список цитируемой литературы

- Петров Н.С., Жидкова О.В., Зенин В.В., Розанов Ю.М., Попов Б.В. 2011. Негативный регулятор клеточного цикла – белок p130 и  $\beta$ -катенин формируют комплекс в мезенхимных стволовых клетках. Цитология. 53(2): 107-115.
- Brummelkamp T.R., Bernards R., Agami R. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*. 296(5567): 550-553.
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162(1): 156-159.
- Herencia C., Rodríguez-Ariza A., Canalejo A., Naranjo A., Briceño F.J., López-Cillero P., De la Mata M., Muñoz-Castañeda J.R. 2011. Differential bone marrow hematopoietic stem cells mobilization in hepatectomized patients. *J Gastrointest Surg*. 15(8): 1459-1467.
- 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/- colon carcinoma. *Science*. 275(5307): 1784-1787.
- Litovchick L., Chestukhin A., DeCaprio J.A. 2004. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates RBL2/p130 during quiescence. *Mol Cell Biol*. 24(20): 8970-8980.
- Moberg K., Starz M.A., Lees J.A. 1996. E2F-4 switches from p130 to p107 and pRB in response to cell cycle reentry. *Mol Cell Biol*. 16(4): 1436-1449.
- Petrov N., Zhidkova O., Serikov V., Zenin V., Popov B. 2012. Induction of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in mouse mesenchymal stem cells is associated with activation of the p130 and E2f4 and formation of the p130/Gsk3 $\beta$ / $\beta$ -catenin complex. *Stem Cells Dev*. 21(4): 587-597.
- Popov B., Chang L.S., Serikov V. 2005. Cell cycle-related transformation of the E2F4-p130 repressor complex. *Biochem Biophys Res Commun*. 336(3): 762-769.
- Sprent J., Cho J.H., Boyman O., Surh C.D. 2008. T cell homeostasis. *Immunol Cell Biol*. 86(4): 312-319.
- Staal F.J., Noort Mv.M., Strous G.J., Clevers H.C. 2002. Wnt signals are transmitted through N-terminally dephosphorylated beta-catenin. *EMBO Rep*. 3(1): 63-68.
- Stambolic V., Ruel L., Woodgett J.R. 1996. Lithium inhibits glycogen syntase kinase-3 activities and mimics Wingless signaling in intact cells. *Curr Biol*. 6(12): 1664-1668.
- You L., He B., Xu Z., Uematsu K., Mazieres J., Mikami I., Reguart N., Moody T.W., Kitajewsky J., McCormick F., Jablons D.M. 2004. Inhibition of Wnt-2-mediated signaling induces programmed cell death in non-small-cell lung cancer cells. *Oncogene*. 23(26): 6170-6174.