

УДК 577

Ингибирование ERK по-разному влияет на дифференцировку клеток нейробластомы, астроцитомы и рабдомиосаркомы

Т. Д. Лебедев*, Э. Р. Вагапова, В. С. Прасолов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

*E-mail: lebedevtd@gmail.com

Поступила в редакцию 24.05.2021

Принята к печати 02.08.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11461

РЕФЕРАТ Киназы ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2) играют важную роль в таких процессах, как пролиферация, выживание и дифференцировка клеток. Нарушение активности этих ферментов может приводить к неконтролируемой пролиферации клеток, иммортализации и нарушению их дифференцировки, что считается одним из ключевых этапов злокачественного перерождения клеток. Нами изучена связь между активностью тирозинкиназ ERK в клетках нейробластомы SH-SY5Y, астроцитомы U-251 и рабдомиосаркомы TE-671 и такими основными чертами дифференцировки, как изменение морфологии клеток и экспрессии генов, кодирующих маркеры дифференцировки и рецепторы факторов роста. Активность ERK определяли с использованием репортерной системы, позволяющей проводить прижизненные измерения активности ERK в отдельных клетках. Показано, что подавление активности ERK с помощью селективных ингибиторов, в отличие от часто используемого индуктора дифференцировки – ретиноевой кислоты, вызывает существенные изменения морфологии клеток TE-671 и экспрессии генов-маркеров миогенной дифференцировки *PROM1*, *MYOG* и *PAX7*. Взаимосвязь между активностью ERK и морфологическими изменениями показана на уровне индивидуальных клеток. При этом дифференцировка клеток SH-SY5Y, индуцированная ретиноевой кислотой, не зависела от ERK. Показано, что ингибирование ERK повышает чувствительность клеток TE-671 к действию ростовых факторов EGF, IGF-1 и NGF предположительно за счет снижения базальной активности ERK и ростового фактора BDNF посредством увеличения экспрессии рецептора TrkB.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА дифференцировка клеток, злокачественные опухоли, ингибиторы ERK, ростовые факторы, флуоресцентный репортер.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ATRA – *all-trans* retinoic acid (третиноин); ERK – extracellular signal-regulated kinases; NGF – nerve growth factor (фактор роста нервов); BDNF – brain-derived neurotrophic factor (нейротрофический фактор мозга); EGF – epidermal growth factor (эпидермальный фактор роста); IGF-1 – insulin-like growth factor (инсулиноподобный фактор роста 1); EGFR – epidermal growth factor receptor (рецептор эпидермального фактора роста); IGF1R – insulin-like growth factor receptor (рецептор инсулиноподобного фактора роста 1); TrkA – tropomyosin receptor kinase A (нейротрофная рецепторная тирозинкиназа A); TrkB – tropomyosin receptor kinase B (нейротрофная рецепторная тирозинкиназа B); MYOG – myogenin (миогенин); FBS – fetal bovine serum (эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота).

ВВЕДЕНИЕ

Киназы ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2) играют ключевую роль в таких важнейших процессах, как пролиферация, выживание и дифференцировка клеток [1, 2]. При этом влияние активации ERK на эти процессы часто зависит от типа клеток, природы активирующего сигнала, его продолжительности и динамики активности ERK, что существенно затрудняет выявление конкретной роли ERK в кле-

точных процессах. Обычно активация ERK связана с сигналами выживания и пролиферации клеток [3]. Тем не менее, в зависимости от типа клеток ингибирование ERK может как стимулировать гибель клеток, так и препятствовать ей [4].

Появление различных репортерных систем, позволяющих отслеживать активность ERK в живых клетках, стимулировало развитие исследований в этой области [5–9]. Тем не менее, пока не суще-

ствуется общепринятой модели, описывающей влияние ERK на дифференцировку клеток. Известно, что ERK прямо блокирует активность таких факторов транскрипции, связанных с плюрипотентностью, как NANOG, OCT4, KLF2 и KLF4 [10, 11]. Снижение активности ERK, например, с помощью ингибиторов MEK, стимулирует самообновление эмбриональных стволовых клеток посредством блокирования ERK-зависимой дифференцировки [12]. При этом в ряде случаев ингибирование ERK стимулирует дифференцировку клеток, например, клеток нейроэктодермы или мезенхимальных стволовых клеток костного мозга [13, 14]. В процессе дифференцировки клеток важную роль играют многие ростовые факторы, такие, как FGF, NGF, PDGF, BDNF, EGF и IGF-1 [15, 16]. На поздних стадиях дифференцировки часто требуются определенные факторы роста, определяющие выживание дифференцированных клеток. При этом многие факторы роста действуют посредством активации ERK. Таким образом, активация ERK может по-разному влиять на процесс дифференцировки в зависимости от стадии и типа клеток.

Активность ERK повышена в большинстве злокачественных опухолей, в частности, за счет активирующих мутаций в сигнальном каскаде MAPK. При этом активирующие мутации в генах RAS блокируют дифференцировку эпидермальных клеток [17–19]. Изучение процессов дифференцировки злокачественных клеток необходимо для понимания процессов онкотрансформации клеток и разработки подходов к терапии опухолей. Так, подходы, основанные на стимуляции дифференцировки клеток с помощью ретиноевой кислоты, применяются в терапии нейробластом [20] и некоторых типов лейкозов [21]. Кроме того, ингибирование сигнального каскада RAS-MEK-ERK рассматривается как перспективный подход к терапии рабдомиосарком, астроцитом и нейробластом [22–24].

При тестировании эффективности ингибиторов ERK на клетках различной природы мы заметили морфологические изменения в некоторых типах клеток, схожие с изменениями, возникающими в процессе дифференцировки. В нашей работе с помощью репортерной системы, которая позволяет прижизненно измерять активность ERK в индивидуальных клетках, проведен количественный анализ взаимосвязи активности ERK и дифференцировки злокачественных клеток различной природы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные культуры и препараты

Перевиваемые клетки рабдомиосаркомы TE-671, астроцитомы U-251, эмбриональные клетки почки

HEK293T культивировали в среде DMEM (Gibco, США), а клетки нейробластомы SH-SY5Y – в среде RPMI-1640 (Gibco), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 1 мМ пируват натрия, 2 мМ L-глутамин, при 37°C и 5% CO₂. Все клеточные линии подарены Heinrich-Pette Institute – Leibniz Institute for Experimental Virology (Гамбург, Германия). В работе использовали полностью *транс*-ретиноевую кислоту (R2625) и краситель ДНК Hoechst 33342 (14533) производства компании Sigma-Aldrich (США). Использовали ингибиторы ERK: SCH772984 (S7101), Ulixertinib (S7854) и VX-11e (S7709) производства компании Selleckchem (США). Все препараты были изначально разведены в ДМСО. Использовали также рекомбинантные факторы роста человека: EGF (ab179628), IGF-1 (ab9573), NGF (ab179616) и BDNF (ab206642) производства компании Abcam (Великобритания).

Получение репортерных клеточных линий ERK-KTR

Лентивирусные частицы, направляющие экспрессию гена, кодирующего репортерный белок ERK-KTR, получены с помощью кальций-фосфатной трансфекции клеток HEK293T с использованием набора ProFection® Mammalian Transfection System (Promega, США, E1200). Использовали упаковывающие плазмиды третьего поколения pMDLg/pRRE, pRSV-Rev и плазмиду, кодирующую белок оболочки VSV-G. Лентивирусный вектор pLentiCMV Puro DEST ERKKTRClover получен из Addgene (#59150). Клетки TE-671, SH-SY5Y и U-251 после лентивирусной трансдукции отбирали на антибиотике пурамицине (Sigma-Aldrich, P7255) до получения более 80% клеток, позитивных по репортерному белку. После лентивирусной трансдукции проводили селекцию клеток TE-671, SH-SY5Y и U-251 на средах, содержащих пурамицин (0.5–2 мкг/мл), что позволило получить популяцию клеток, более 80% которых содержали репортерный белок.

Программная обработка изображений клеток и расчет активности ERK и длины клеток

Микрофотографии клеток получали на автоматизированном флуоресцентном микроскопе Leica DMI8 (Германия). Изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения CellProfiler 4. Для определения сегментации ядер, окрашенных красителем Hoechst 33342, использовали алгоритм бинаризации полутоновых изображений методом Оцу. Границы цитоплазмы определяли по наличию сигнала флуоресцентного репортера ERK-KTR, используя положение ядер для определения границ клеток с помо-

щью алгоритма бинаризации изображений Sauvola Thresholding. Для расчета длины цитоскелета и клеточных отростков сначала задавали тело клетки (область радиусов в 3–5 пикселей вокруг ядра), после чего проводили бинаризацию цитоскелета по наличию сигнала флуоресцентного репортера. Параметры бинаризации подбирали на всех этапах для каждого типа клеток. Неправильно распознанные клетки, устранение выбросов и артефактов, последующую обработку данных проводили с помощью оригинальных алгоритмов в Python 3.8. Используемые протоколы для CellProfiler доступны по ссылке: <https://github.com/CancerCellBiology/ActaNaturae-2021>.

Измерение экспрессии генов

Суммарную РНК выделяли методом хлороформ-тризольной экстракции реагентом TRIzol (Thermo Scientific, США, 15596018) согласно протоколу производителя. Суммарную РНК (1 мкг) использовали для получения кДНК с помощью набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, K1622) согласно протоколу производителя. Экспрессию анализировали методом ПЦР в реальном времени с использованием набора qPCRMix-HS SYBR («Евроген», Россия, PK147L) на приборе Bio-Rad CFX96 (США). Результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager 3.1 и GraphPad Prism 9.1. Список праймеров приведен в *таблице*.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Создание клеточных линий, экспрессирующих репортер ERK-KTR

Роль ERK в дифференцировке клеток мы изучали на трех линиях злокачественных клеток различной природы, способных к дифференцировке *in vitro*: клетках нейробластомы SH-SY5Y, астроцитомы U-251 MG и рабдомиосаркомы TE-671. С помощью лентивирусной трансдукции клеток этих линий получены клетки, экспрессирующие репортер активности ERK – ERK-KTR (kinase translocation reporter) – химерный белок, состоящий из участка белка ELK1, с которым связываются киназы ERK1/2, сигналов ядерной локализации NLS (nuclear localization signal) и ядерного экспорта NES (nuclear extraction signal), а также зеленого флуоресцентного белка mClover [25]. Сигнал NLS в составе химерного белка активирован в отличие от NES, что обеспечивает преимущественно ядерную локализацию репортерного белка. Активированные киназы ERK1/2 попадают в ядро клетки, где связываются с участком белка ELK1 и фосфорилируют участки NLS и NES. Это приводит к активации сигнала экспорта из ядра

Праймеры, использованные в ПЦР в реальном времени

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
GAPDH pr1	GAGCCCGCAGCCTCCCGCT
GAPDH pr2	GCGCCCAATACGACCAAATC
PROM1 pr1	CCTGGTCCAACAGGGCTATC
PROM1 pr2	TCGTGGTTTGCGGTTGTA
RBFOX3 pr1	CAGACAGTGCCGCAGACAG
RBFOX3 pr2	TTCTCTGTAGGGTTCGGAGGG
TUBB3 pr1	ATGAGCATGGCATCGACCC
TUBB3 pr2	AGGCACGTACTTGTGAGAAGA
MYOG pr1	TCAGCTCCCTCAACCAGGAG
MYOG pr2	CCGTGAGCAGATGATCCCC
PAX7 pr1	CACTGTGACCGAAGCACTGT
PAX7 pr2	TCCAGCCGGTTCCCTTTGT
EGFR pr1	AGGAGAGGAGAACTGCCAGAA
EGFR pr2	TCTCGGAATTTGCGGCAGAC
IGF1R pr1	CATCCGACGGGGGAATAACA
IGF1R pr2	GCTGCAAGTTCTGGTTGTCG
NTRK1 pr1	CCATCCCTGACACTAACAGCA
NTRK1 pr2	GCACAAGGAGCAGCGTAGAA
NTRK2 pr1	CTGAACCAAGCACGGTTTCC
NTRK2 pr2	CAGGGGCAGAAACTCCAGAA

и деактивации сигнала ядерной локализации, в результате чего репортерный белок транспортируется из ядра в цитоплазму. В цитоплазме под действием клеточных фосфатаз репортерный белок дефосфорилируется и переходит обратно в ядро. В зависимости от уровня активности ERK устанавливается баланс в распределении репортерного белка в ядре и цитоплазме. Присутствие флуоресцентного белка в составе репортера позволяет оценить активность ERK по соотношению интенсивности сигнала от флуоресцентного белка в цитоплазме и ядре. Таким образом, репортер ERK-KTR позволяет прижизненно определять активность ERK в индивидуальных клетках с помощью флуоресцентного микроскопа.

Далее мы обработали клетки, экспрессирующие репортер ERK-KTR, ингибиторами ERK и полностью *транс*-ретиноевой кислотой (ATRA), которая широко используется для индукции дифференцировки клеток различных типов, а также в терапии нейробластомы. Для первоначального теста мы выбрали три ингибитора ERK, которые показали свою эффективность в клинических испытаниях: SCH722984, Ulixertinib и VX-11e. Клетки обрабатывали ингибиторами ERK (250 нМ) или ATRA (10 мкМ) в течение 72 ч, а затем делали фотографии на флуоресцентном микроскопе. Все ингибиторы существенно снизили активность ERK, что видно по изменению распределения флуоресцентного сигнала в ядре и цитоплазме (*рис. 1А*). Мы также заметили морфологические изменения клеток SH-SY5Y

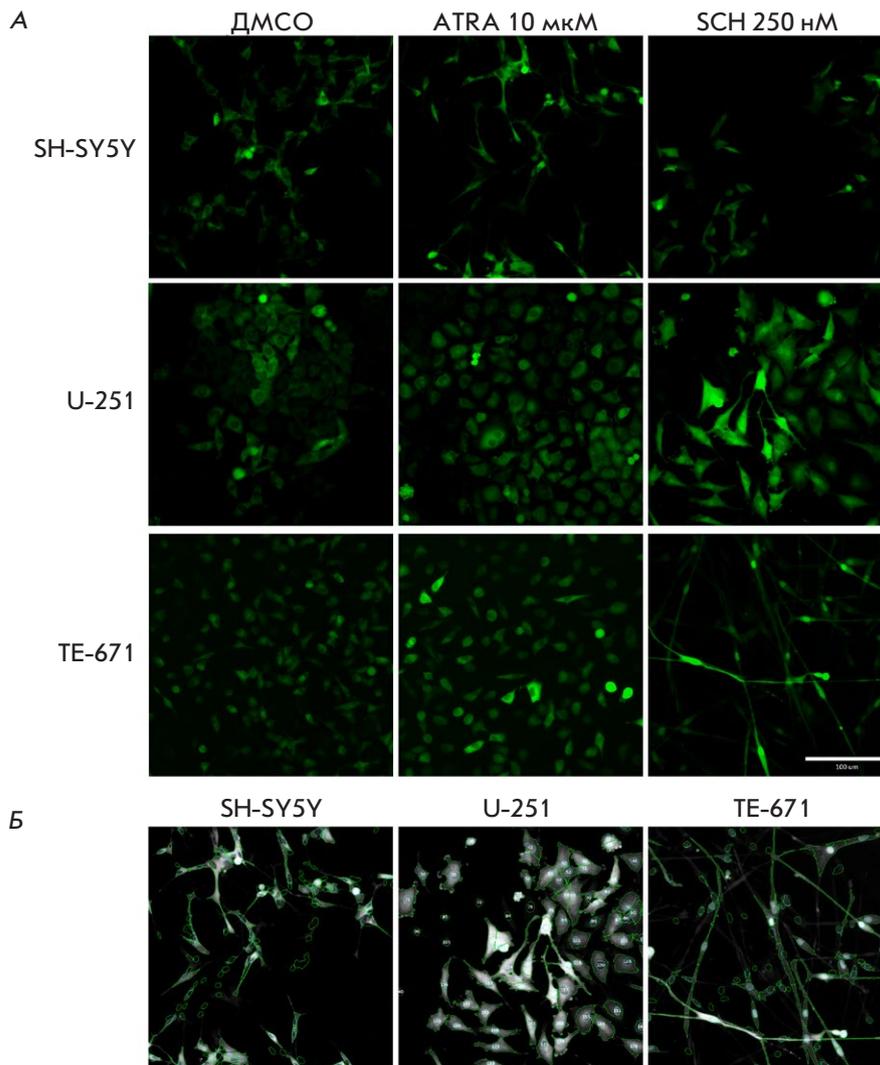


Рис. 1. Клетки SH-SY5Y, U-251 и TE-671, экспрессирующие репортер ERK-KTR. А – фотографии клеток SH-SY5Y, U-251 и TE-671 через 72 ч после добавления 10 мкМ транс-ретиноевой кислоты (ATRA) или 250 нМ ингибитора ERK SCH772984 (SCH). Б – обработка фотографий клеток с помощью программного обеспечения CellProfiler 4. Фотографии приведены в градиенте серого. Зеленым выделены границы цитоплазмы клеток, синим – ядра клеток, определенные с помощью окрашивания красителем ДНК Hoechst 33342

под действием ATRA; TE-671 и U-251 – под действием ингибиторов ERK. Наиболее выраженные изменения вызывал препарат SCH772984 (рис. 1А). Наблюдаемые морфологические изменения включали удлинение клеточных отростков и цитоскелета в целом, особенно в клетках TE-671. Эти изменения похожи на описанные ранее морфологические изменения, характерные для дифференцировки клеток. Для численного анализа наблюдаемых изменений мы создали алгоритмы для программы CellProfiler 4, которые позволяют определить ядра клеток (предварительно окрашенные красителем Hoechst 33342) и цитоплазму каждой клетки по флуоресценции белка mClover (рис. 1Б). На основании медианных интенсивностей mClover в ядре и цитоплазме рассчитана активность ERK в отдельных клетках, а по форме цитоплазмы измерена длина цитоскелета клеток с учетом отростков. Такой алгоритм позволил оценить изменения средней активности ERK и длины цитоскелета при каждом воздействии,

а также сопоставить активность ERK и изменения длины цитоскелета в индивидуальных клетках.

Активность ERK связана с дифференцировкой клеток

Воздействие ретиноевой кислоты привело к снижению активности ERK в клетках всех трех линий: SH-SY5Y, U-251 и TE-671. Однако это снижение было менее выраженным по сравнению с действием ингибиторов ERK SCH772984, Ulixertinib и VX-11e (рис. 2А). При этом ретиноевая кислота вызвала удлинение отростков только у клеток нейробластомы SH-SY5Y. Индукция дифференцировки и, как следствие, удлинение клеточных отростков – хорошо известное действие ретиноевой кислоты на клетки нейробластомы. Ингибиторы ERK, в свою очередь, не вызывали удлинения цитоскелета клеток SH-SY5Y (рис. 2Б). Интересно, что в клетках U-251 и TE-671 мы наблюдали обратные эффекты. Так, ретиноевая кислота не влияла на длину клеток

TE-671 и даже уменьшала длину U-251. При этом ингибиторы ERK, особенно SCH772984, существенно увеличивали длину клеток TE-671 и U-251, в том числе за счет удлинения клеточных отростков (рис. 2Б). Стоит также отметить, что препарат SCH772984 оказался наиболее сильным ингибитором ERK (рис. 2А), и именно он наиболее сильно влиял на длину клеток U-251 и TE-671.

Чтобы проверить, связаны ли наблюдаемые морфологические изменения с дифференцировкой клеток, мы измерили экспрессию мРНК генов, кодирующих маркеры дифференцировки (рис. 2В). Мы измерили экспрессию гена *PROM1*, который кодирует белок CD133, во всех клетках. Экспрессия этого гена характерна для недифференцированных клеток, в том числе для злокачественных стволовых клеток нейробластомы, глиобластомы и недифференцированных клеток рабдомиосаркомы. Также мы выбрали гены, экспрессия которых может меняться при дифференцировке нейтральных клеток: *RBFOX3*, который кодирует белок NeuN [26, 27], а также ген β 3-тубулина *TUBB3* [27]. Поскольку известно, что клетки рабдомиосаркомы TE-671 могут дифференцироваться в мышечные клетки, то для анализа дифференцировки этих клеток мы выбрали ген миогенина *MYOG* и транскрипционного фактора *PAX7* [28]. Миогенин – это один из основных маркеров дифференцировки мышечных клеток, а фактор *PAX7* является важным регулятором ранней дифференцировки таких клеток. Нами обнаружен существенный рост экспрессии генов *MYOG* и *PAX7*, а также снижение экспрессии *PROM1* в клетках TE-671 после воздействия SCH772984. Ретиноевая кислота не вызвала заметных изменений в экспрессии данных генов. Отмечено также небольшое снижение экспрессии *PROM1* в клетках U-251, обработанных SCH772984, и снижение экспрессии *TUBB3* после воздействия ретиноевой кислоты. В клетках SH-SY5Y не обнаружено существенных изменений экспрессии генов. Интересно, что клетки TE-671, длина которых под действием SCH772984 увеличилась наиболее сильно, имели низкую активность ERK (рис. 2Г). Эти данные указывают на существование связи между активностью тирозинкиназы ERK и дифференцировкой клеток TE-671 на уровне как всей популяции, так и индивидуальных клеток.

Ингибирование ERK меняет экспрессию рецепторов ростовых факторов

Как ингибитор ERK SCH772984 и ретиноевая кислота влияют на чувствительность клеток к ростовым факторам? Чтобы понять это, мы обработали клетки препаратами в течение 72 ч, а затем отмыли от культуральной среды, содержащей препараты, и добавили

к клеткам среду без сыворотки, поскольку содержащиеся в сыворотке ростовые факторы могут сильно влиять на активность ERK. Через 12 ч после смены среды к клеткам добавляли ростовые факторы в концентрации 100 нг/мл. Мы выбрали факторы роста, которые могут активировать ERK в клетках различной природы, участвуют в нейтральной или миогенной дифференцировке и могут стимулировать выживание клеток: эпидермальный фактор роста (EGF) [29], инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1) [30], фактор роста нервов (NGF) [15, 31] и нейротрофический фактор мозга BDNF [15]. Все ростовые факторы значительно активировали ERK в клетках нейробластомы SH-SY5Y, в том числе после индукции дифференцировки клеток ретиноевой кислотой и обработки клеток ингибитором ERK SCH772984 (рис. 3А). Ростовые факторы также активировали ERK в контрольных клетках астроцитомы U-251 (обработанных только ДМСО) и клетках, обработанных SCH772984 (рис. 3А). Однако обработка клеток U-251 ретиноевой кислотой привела к менее выраженному эффекту EGF, IGF-1 и BDNF. Интересно, что мы не обнаружили статистически значимого влияния ростовых факторов на контрольные клетки TE-671 и клетки, обработанные ретиноевой кислотой. Дифференцировка клеток TE-671, вызванная SCH772984, сделала клетки чувствительными ко всем факторам роста. Важно отметить, что недифференцированные клетки TE-671 в среде без сыворотки имели высокую активность ERK, сравнимую с активностью в присутствии сыворотки, тогда как после обработки ингибитором ERK в течение 72 ч базальная активность ERK была значительно ниже. Возможно, что изначально высокая базальная активность ERK в TE-671 не позволяет выявлять значимые изменения активности ERK под действием ростовых факторов. Тем не менее, даже после продолжительного воздействия ингибитора ERK SCH772984 все клетки либо сохранили, либо приобрели способность реагировать на действие факторов роста (рис. 3А).

Поскольку действие факторов роста может зависеть как от базальной активности ERK, так и от изменения представленности рецепторов факторов роста в ходе дифференцировки, мы измерили изменение экспрессии мРНК рецепторов. С этой целью выбрали гены *NTRK1* и *NTRK2*, кодирующие основные рецепторы использованных факторов роста NGF и BDNF (TrkA и TrkB); *IGF1R*, кодирующий рецептор IGF-1; и *EGFR*, кодирующий рецептор EGF. Экспрессия гена *NTRK2* – одного из основных маркеров дифференцировки клеток нейробластомы, существенно увеличилась в клетках SH-SY5Y под действием ретиноевой кислоты (рис. 3Б). Аналогичные изменения экспрессии

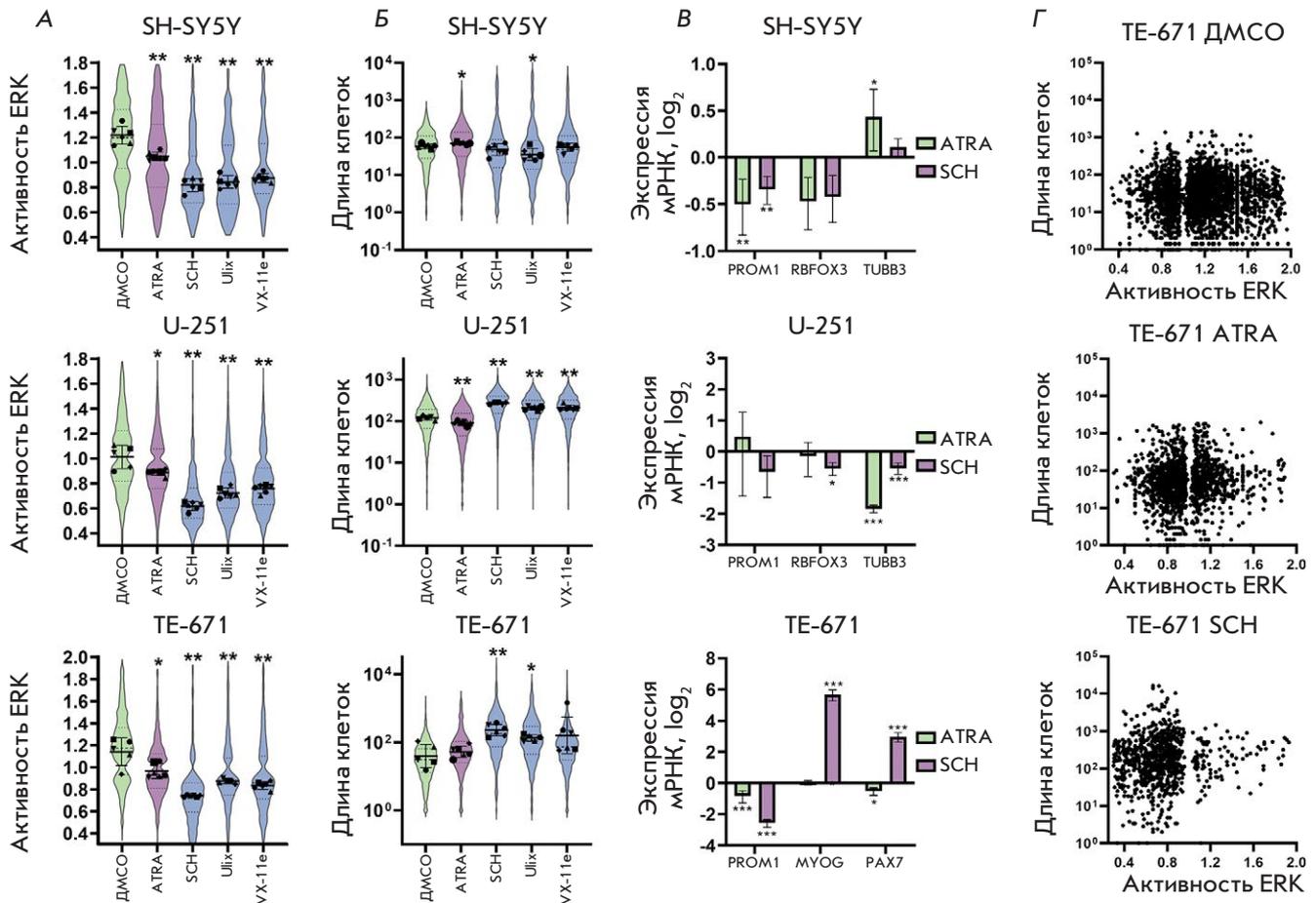


Рис. 2. Изменения активности ERK и длины клеток под действием ретиноевой кислоты и ингибиторов ERK. А – распределения активности (скрипичные диаграммы) ERK в клетках SH-SY5Y, U-251 и TE-671 через 72 ч после добавления 10 мкМ транс-ретиноевой кислоты (ATRA) или 250 нМ ингибиторов ERK SCH772984 (SCH), Ulixertinib (Ulix) и VX-11e. В качестве контроля к клеткам добавляли ДМСО, поскольку все препараты разведены в ДМСО. Каждое измерение проводили для фотографий шести полей, выбранных случайным образом (медианные значения для каждого поля отмечены точками). На графиках приведены значения отношения интенсивности сигнала репортерного белка в цитоплазме к сигналу в ядре. Б – распределения длины клеток (скрипичные диаграммы) в пикселях через 72 ч после добавления препаратов. Скрипичные диаграммы построены по результатам измерения активности ERK и длины не менее чем 300 уникальных клеток. Точками указаны медианные значения для каждого из шести проанализированных независимых полей, выбранных случайным образом. На скрипичных диаграммах отмечены стандартные отклонения (SD), статистическую значимость определяли непараметрическим тестом по U-критерию Манна–Уитни. В – результаты измерения экспрессии генов *PROM1* (CD133), *RBFOX3* (NeuN), *TUBB3* (β 3-тубулин), *MYOG* (миогенин) и *PAX7* с помощью ПЦР в реальном времени, через 72 ч после добавления препаратов. Данные ПЦР нормированы на экспрессию гена *GAPDH* в каждой пробе, результаты представлены как логарифм изменения экспрессии гена относительно контроля (клетки, обработанные ДМСО). Опыты по измерению экспрессии генов выполнены в трех повторах. На графиках показаны средние значения изменения экспрессии и 95% доверительный интервал. Статистическую значимость определяли методом *t*-критерия Стьюдента. Г – распределение активности ERK и длины индивидуальных клеток линии TE-671 через 72 ч после добавления препаратов. Активность ERK выражена в единицах отношения интенсивности сигнала репортерного белка в цитоплазме к сигналу в ядре. Длина указана в количестве пикселей, которые занимает клетка на фотографии. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

NTRK2 мы обнаружили в клетках TE-671, обработанных SCH772984. Ретиноевая кислота вызвала небольшой рост экспрессии *NTRK1* в клетках TE-671 и SH-SY5Y. При этом в клетках U-251 экспрессия *NTRK1* существенно снизилась после об-

работки ретиноевой кислотой, а экспрессия *NTRK2* снизилась под воздействием и ретиноевой кислоты, и SCH772984 (рис. 3Б). Не обнаружено значительных изменений экспрессии *EGFR* и *IGF1R*. Эти данные указывают на то, что повышенная чувствитель-

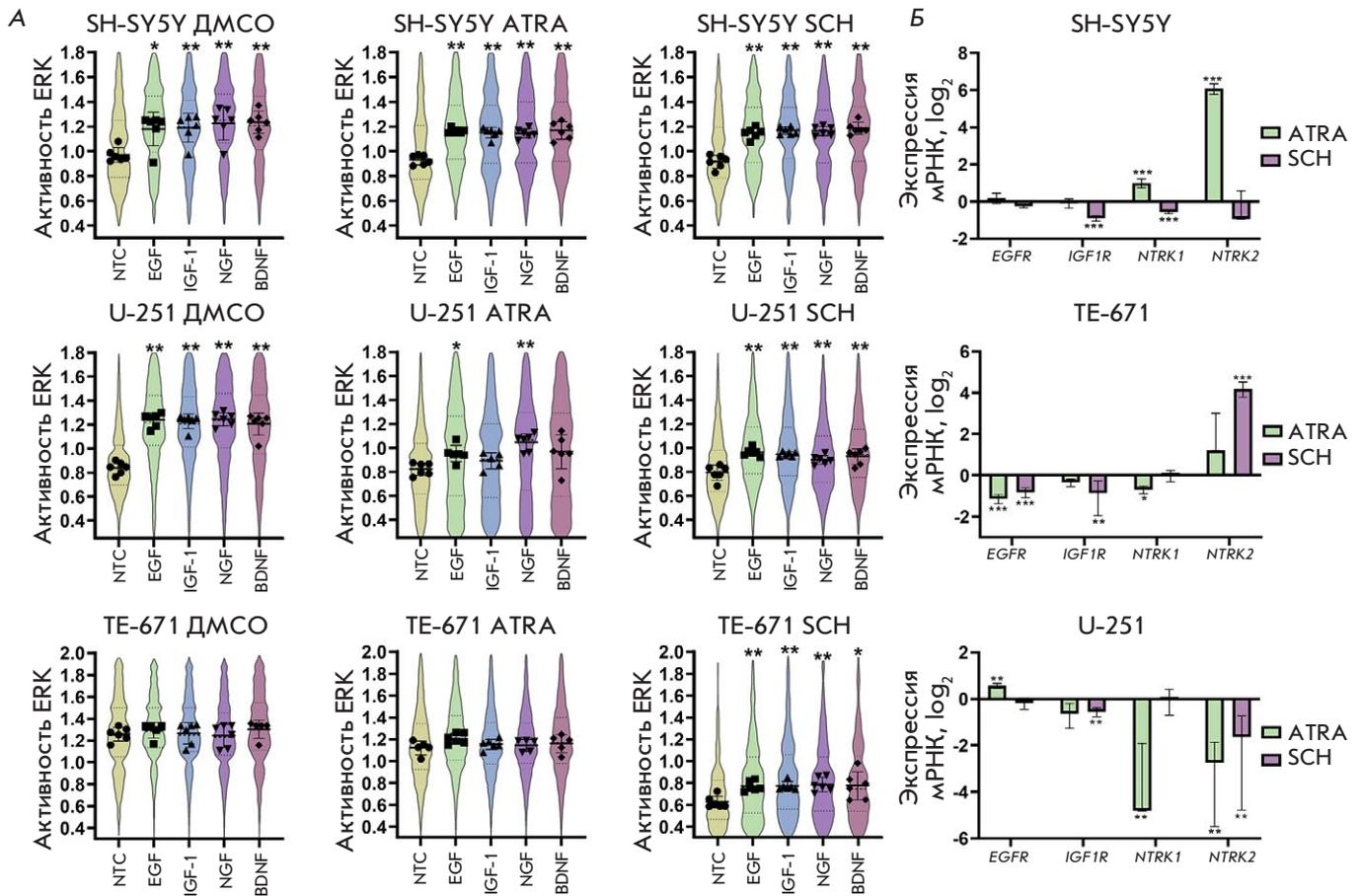


Рис. 3. Влияние ингибирования ERK и ретиноевой кислоты на действие факторов роста. А – распределения активности (скрипичные диаграммы) ERK через 30 мин после добавления факторов роста EGF, IGF-1, NGF и BDNF (100 нг /мл каждый) к клеткам SH-SY5Y, U-251 и TE-671, предварительно обработанным 10 мкМ ретиноевой кислоты (ATRA) или 250 нМ ингибитора ERK SCH772984 (SCH) в течение 72 ч. Обработку клеток ДМСО использовали в качестве контроля. NTC (non-treated control) – клетки, к которым добавляли культуральную среду без ростовых факторов. Точками указаны медианные значения для каждого из шести проанализированных независимых полей, выбранных случайным образом. На скрипичных диаграммах отмечены стандартные отклонения (SD), статистическую значимость определяли непараметрическим тестом по U-критерию Манна–Уитни. Б – результаты измерения экспрессии генов *EGFR*, *IGF1R*, *NTRK1* (*TrkA*) и *NTRK2* (*TrkB*) с помощью ПЦР в реальном времени через 72 ч после добавления препаратов. Данные ПЦР нормированы на экспрессию гена *GAPDH* в каждой пробе, результаты представлены как логарифм изменения экспрессии гена относительно контроля (клетки, обработанные ДМСО). Опыты по измерению экспрессии генов выполнены в трех повторах. Показаны средние значения изменения экспрессии и 95% доверительный интервал. Статистическую значимость определяли с использованием *t*-критерия Стьюдента. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

ность клеток TE-671 к ростовым факторам может быть связана как со снижением базального уровня активности ERK, так и с ростом экспрессии рецепторов, например, в случае *TrkA* и *TrkB*.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы изучили влияние ретиноевой кислоты на активность ERK, а также влияние ингибирования ERK на процессы дифференцировки злокачественных клеток трех типов. Нами обнаружена прямая связь между снижением активности тирозинкиназы ERK в клетках астроцитомы U-251

и рабдомиосаркомы TE-671 и морфологически изменениями этих клеток, ассоциированными с дифференцировкой. Воздействие ингибитора ERK SCH772984 в течение 72 ч на клетки TE-671 привело к значительному увеличению экспрессии гена миогенина *MYOG*. Повышенная экспрессия миогенина считается основным маркером дифференцировки скелетных мышц [32]. Обнаружено снижение экспрессии гена *PROM1*, характерного для злокачественных стволовых клеток. Совокупность изменений в экспрессии генов *PROM1* и *MYOG* и значительные морфологические изменения кле-

ток TE-671, обусловленные действием SCH772984, указывают на индукцию миогенной дифференцировки. Полученные нами результаты согласуются с опубликованными данными, согласно которым ингибиторы MEK инициируют дифференцировку клеток рабдомиосаркомы [22]. При этом ингибирование MEK в течение 72 ч приводит к снижению экспрессии гена PAX7 [28], тогда как при прямом ингибировании ERK наблюдали существенный рост экспрессии PAX7. Считается, что PAX7 необходим для инициации миогенной дифференцировки и уровень его экспрессии повышен в ранних клетках-предшественниках скелетных мышц [33]. На поздних стадиях дифференцировки экспрессия PAX7 обычно снижается, однако нет однозначных данных о влиянии изменения экспрессии PAX7 на дифференцировку клеток при подавлении ERK. Наблюдаемые различия в экспрессии PAX7 связаны, возможно, с различиями в эффектах ингибирования MEK и ERK. Мы не обнаружили существенных изменений в экспрессии маркеров нейральной дифференцировки NeuN и β 3-тубулина на уровне мРНК в клетках SH-SY5Y и U-251, обработанных ретиноевой кислотой или ингибитором ERK SCH772984. Однако в клетках SH-SY5Y ретиноевая кислота вызвала значительное увеличение экспрессии рецептора TrkB – основного маркера дифференцировки этих клеток. Интересно, что дифференцировка клеток TE-671, вызванная ингибированием ERK, приводила к повышению экспрессии TrkB. Это указывает на возможное сходство в регуляции экспрессии TrkB в этих типах клеток при дифференцировке. В случае клеток астроцитомы U-251 требуется подбор маркеров дифференцировки, подходящих для проведения ПЦР-анализа.

С помощью репортерной системы ERK-KTR мы показали, что длина клеток TE-671 зависит от уровня снижения активности ERK как во всей популяции, так и в каждой отдельной клетке. Это указывает на существование прямой взаимосвязи между активностью ERK и дифференцировкой клеток. Аналогичные результаты получены для клеток астроцитомы U-251. Дифференцировка клеток нейробластомы SH-SY5Y с помощью ретиноевой кислоты также привела к снижению активности ERK. Однако прямое ингибирование ERK в клетках SH-SY5Y не приводит к инициации дифференцировки, что указывает на вторичную роль снижения активности ERK под действием ретиноевой кислоты. Некоторые исследования показывают, что активация ERK в нейральных стволовых клетках или ранних предшественниках инициирует дифференцировку в нейроны и подавляет дифференцировку в глиальные клетки [34, 35]. Следует отметить, что в астроци-

томах [36] и рабдомиосаркомах [37, 38] часто встречаются мутации непосредственно в сигнальном каскаде MAPK, приводящие к гиперактивации ERK, тогда как в нейробластомах такие мутации находят относительно редко. Клетки TE-671 содержат мутацию в гене NRAS(Q61H) [39, 40], которая приводит к гиперактивации ERK, а клетки U-251 – делецию гена NF1 [41], который кодирует белок нейрофибромин – негативный регулятор активности белков RAS и всего сигнального каскада RAS-MEK-ERK [42]. Мутация в рецепторной тирозинкиназе ALK(F1174L) тоже приводит к активации ERK в клетках SH-SY5Y, однако не регулирует непосредственно сигнальный каскад RAS-MEK-ERK. Возможно, что именно мутации в каскаде RAS-MEK-ERK обуславливают инициацию дифференцировки клеток TE-671 и U-251 в результате ингибирования ERK [40].

У нашего исследования имеется несколько ограничений. Хотя мы видим возникновение морфологических изменений и изменений в экспрессии генов под действием ингибиторов ERK, но не можем сказать, до какой именно стадии происходит дифференцировка клеток. Кроме того, неизвестно, возможна ли дифференцировка клеток TE-671 в полноценные мышечные клетки при ингибировании ERK. Тем не менее, ингибирование ERK может быть, как минимум, инициирующим событием, которое не препятствует действию ростовых факторов. Также нельзя однозначно утверждать, что наблюдаемые изменения морфологии клеток U-251 являются именно дифференцировкой. Поэтому необходимо проведение дополнительных опытов, в том числе поиск надежных маркеров дифференцировки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе показана связь морфологических изменений, ассоциированных с дифференцировкой клеток TE-671, U-251 и SH-SY5Y, и активностью киназы ERK, в том числе на уровне отдельных клеток. Нами показано, что ингибирование ERK в клетках рабдомиосаркомы TE-671 инициирует их миогенную дифференцировку. Дифференцировка делает клетки TE-671 более чувствительными к действию ростовых факторов потенциально за счет снижения базальной активности ERK и увеличения экспрессии рецептора TrkB. Полученные данные могут использоваться для разработки новых протоколов дифференцировки клеток, в том числе для фундаментальных исследований и разработки новых подходов к терапии злокачественных заболеваний. ●

*Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда
(проект № 19-74-00120).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lavoie H., Gagnon J., Therrien M. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020. V. 21. № 10. P. 607–632.
2. Orlova N.N., Lebedev T.D., Spirin P.V., Prassolov V.S. // *Mol. Biol. (Moscow)*. 2016. V. 50. № 3. P. 395–405.
3. Bonni A., Brunet A., West A.E., Datta S.R., Takasu M.A., Greenberg M.E. // *Science*. 1999. V. 286. № 5443. P. 1358–1362.
4. Spirin P., Lebedev T., Orlova N., Morozov A., Poymenova N., Dmitriev S.E., Buzdin A., Stocking C., Kovalchuk O., Prassolov V. // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 34. P. 56991–57002.
5. Ma M., Bordignon P., Dotto G.P., Pelet S. // *Heliyon*. 2020. V. 6. № 12. P. e05574.
6. Simon C.S., Rahman S., Raina D., Schroter C., Hadjantoniakis A.K. // *Dev. Cell*. 2020. V. 55. № 3. P. 341–353 e345.
7. Pokrass M.J., Ryan K.A., Xin T., Pielstick B., Timp W., Greco V., Regot S. // *Dev. Cell*. 2020. V. 55. № 3. P. 328–340 e325.
8. Ogura Y., Sami M.M., Wada H., Hayashi S. // *Genes Cells*. 2019. V. 24. № 4. P. 297–306.
9. Maryu G., Matsuda M., Aoki K. // *Cell Struct. Funct.* 2016. V. 41. № 2. P. 81–92.
10. Hamilton W.B., Mosesson Y., Monteiro R.S., Emdal K.B., Knudsen T.E., Francavilla C., Barkai N., Olsen J.V., Brickman J.M. // *Nature*. 2019. V. 575. № 7782. P. 355–360.
11. Spelat R., Ferro F., Curcio F. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 45. P. 38279–38288.
12. Ying Q.L., Wray J., Nichols J., Batlle-Morera L., Doble B., Woodgett J., Cohen P., Smith A. // *Nature*. 2008. V. 453. № 7194. P. 519–523.
13. Tamama K., Sen C.K., Wells A. // *Stem Cells Dev.* 2008. V. 17. № 5. P. 897–908.
14. Yu Y., Wang X., Zhang X., Zhai Y., Lu X., Ma H., Zhu K., Zhao T., Jiao J., Zhao Z.A., et al. // *Stem Cell Res. Ther.* 2018. V. 9. № 1. P. 2.
15. Liu F., Xuan A., Chen Y., Zhang J., Xu L., Yan Q., Long D. // *Mol. Med. Rep.* 2014. V. 10. № 4. P. 1739–1745.
16. Yan L., Zhou L., Yan B., Zhang L., Du W., Liu F., Yuan Q., Tong P., Shan L., Efferth T. // *Cell Death Dis.* 2020. V. 11. № 10. P. 857.
17. Khavari T.A., Rinn J. // *Cell Cycle*. 2007. V. 6. № 23. P. 2928–2931.
18. Kern F., Niault T., Baccarini M. // *Br. J. Cancer*. 2011. V. 104. № 2. P. 229–234.
19. Olson E.N., Spizz G., Tainsky M.A. // *Mol. Cell. Biol.* 1987. V. 7. № 6. P. 2104–2111.
20. Reynolds C.P., Matthy K.K., Villablanca J.G., Maurer B.J. // *Cancer Lett.* 2003. V. 197. № 1–2. P. 185–192.
21. Tallman M.S., Andersen J.W., Schiffer C.A., Appelbaum F.R., Feusner J.H., Ogden A., Shepherd L., Willman C., Bloomfield C.D., Rowe J.M., et al. // *N. Engl. J. Med.* 1997. V. 337. № 15. P. 1021–1028.
22. Yohe M.E., Gryder B.E., Shern J.F., Song Y.K., Chou H.C., Sindiri S., Mendoza A., Patidar R., Zhang X., Guha R., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2018. V. 10. № 448. P. eaan4470.
23. Forsheew T., Tatevossian R.G., Lawson A.R., Ma J., Neale G., Ogunkolade B.W., Jones T.A., Aarum J., Dalton J., Bailey S., et al. // *J. Pathol.* 2009. V. 218. № 2. P. 172–181.
24. Tanaka T., Higashi M., Kimura K., Wakao J., Fumino S., Iehara T., Hosoi H., Sakai T., Tajiri T. // *J. Pediatr. Surg.* 2016. V. 51. № 12. P. 2074–2079.
25. Regot S., Hughey J.J., Bajar B.T., Carrasco S., Covert M.W. // *Cell*. 2014. V. 157. № 7. P. 1724–1734.
26. Gusel'nikova V.V., Korzhhevskiy D.E. // *Acta Naturae*. 2015. V. 7. № 2. P. 42–47.
27. Constantinescu R., Constantinescu A.T., Reichmann H., Janetzky B. // *J. Neural. Transm. Suppl.* 2007. № 72. P. 17–28.
28. De Luna N., Suarez-Calvet X., Garicano M., Fernandez-Simon E., Rojas-Garcia R., Diaz-Manera J., Querol L., Illa I., Gallardo E. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2018. V. 77. № 10. P. 964–972.
29. Garcez R.C., Teixeira B.L., Schmitt Sdos S., Alvarez-Silva M., Trentin A.G. // *Cell Mol. Neurobiol.* 2009. V. 29. № 8. P. 1087–1091.
30. Galvin C.D., Hardiman O., Nolan C.M. // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2003. V. 200. № 1–2. P. 19–29.
31. Lebedev T.D., Vagapova E.R., Popenko V.I., Leonova O.G., Spirin P.V., Prassolov V.S. // *Front. Oncol.* 2019. V. 9. P. 1046.
32. Bentzinger C.F., Wang Y.X., Rudnicki M.A. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012. V. 4. № 2. P. a008342.
33. Florkowska A., Meszka I., Zawada M., Legutko D., Proszynski T.J., Janczyk-Ilach K., Streminska W., Ciemerych M.A., Grabowska I. // *Stem Cell Res. Ther.* 2020. V. 11. № 1. P. 238.
34. Paquin A., Barnabe-Heider F., Kageyama R., Miller F.D. // *J. Neurosci.* 2005. V. 25. № 46. P. 10747–10758.
35. Samuels I.S., Karlo J.C., Faruzzi A.N., Pickering K., Her-rup K., Sweatt J.D., Saitta S.C., Landreth G.E. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. № 27. P. 6983–6995.
36. Jones D.T., Gronych J., Lichter P., Witt O., Pfister S.M. // *Cell Mol. Life Sci.* 2012. V. 69. № 11. P. 1799–1811.
37. Marampon F., Bossi G., Ciccarelli C., Di Rocco A., Sacchi A., Pestell R.G., Zani B.M. // *Mol. Cancer Ther.* 2009. V. 8. № 3. P. 543–551.
38. Ciccarelli C., Vulcano F., Milazzo L., Gravina G.L., Marampon F., Macioce G., Giampaolo A., Tombolini V., Di Paolo V., Hassan H.J., et al. // *Mol. Cancer*. 2016. V. 15. P. 16.
39. Stratton M.R., Darling J., Pilkington G.J., Lantos P.L., Reeves B.R., Cooper C.S. // *Carcinogenesis*. 1989. V. 10. № 5. P. 899–905.
40. Dolgikh N., Hugle M., Vogler M., Fulda S. // *Cancer Res.* 2018. V. 78. № 8. P. 2000–2013.
41. McGillicuddy L.T., Fromm J.A., Hollstein P.E., Kubek S., Beroukhir R., De Raedt T., Johnson B.W., Williams S.M., Nghiemphu P., Liau L.M., et al. // *Cancer Cell*. 2009. V. 16. № 1. P. 44–54.
42. Cichowski K., Jacks T. // *Cell*. 2001. V. 104. № 4. P. 593–604.