

УДК 576.32/.36

Внеклеточные везикулы метастатической меланомы переносят мРНК $\alpha 7$ -nAChR, увеличивая поверхностную экспрессию рецептора в нормальных кератиноцитах и стимулируя их рост

М. Л. Бычков¹, А. В. Кириченко^{1,2}, И. Н. Михайлова³, А. С. Парамонов¹, М. П. Кирпичников^{1,4}, М. А. Шулепко¹, Е. Н. Люкманова^{1,4*}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Московская область, 141701 Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, 115548 Россия

⁴Междисциплинарная научно-образовательная школа «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология», Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

*E-mail: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.04.2022

Принята к печати 27.07.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11734

РЕФЕРАТ Ранее нами было показано, что внеклеточные везикулы, секретируемые клетками метастатической меланомы кожи, стимулируют рост, миграцию и стволовость нормальных кератиноцитов. В работе мы впервые показываем, что внеклеточные везикулы, секретируемые клетками метастатической меланомы линий mel H, mel Kog и mel P, содержат как на уровне мРНК, так и на уровне белка никотиновый ацетилхолиновый рецептор $\alpha 7$ типа ($\alpha 7$ -nAChR), который участвует в регуляции онкогенных сигнальных путей в эпителиальных клетках. Инкубация с везикулами, секретируемыми клетками mel H и имеющими наибольшее содержание мРНК $\alpha 7$ -рецептора, приводит к увеличению поверхностной экспрессии $\alpha 7$ -nAChR в нормальных кератиноцитах Het-1A, а также к стимуляции их роста. При этом наблюдается отмена обоих этих эффектов в присутствии ингибитора $\alpha 7$ -nAChR – α -бунгаротоксина. Биоинформатический анализ выявил корреляцию между повышенной экспрессией гена $\alpha 7$ -nAChR у пациентов с метастатической меланомой и неблагоприятным прогнозом выживаемости. Таким образом, внеклеточные везикулы метастатической меланомы могут переносить мРНК $\alpha 7$ -nAChR, усиливая поверхностную экспрессию этого рецептора и стимулируя рост нормальных кератиноцитов, а таргетирование этого рецептора может стать новой стратегией контроля злокачественной трансформации кератиноцитов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА $\alpha 7$ -nAChR, везикулы, метастатическая меланوما, кератиноциты, онкотерапия, рак.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ $\alpha 7$ -nAChR – никотиновый рецептор ацетилхолина типа $\alpha 7$; BEBM – среда роста бронхиального эпителия; α -Bgtx – α -бунгаротоксин; HRP – пероксидаза хрена; WST-1 – водорастворимая соль тетразолия 1.

ВВЕДЕНИЕ

Меланома – агрессивная опухоль, развивающаяся из меланоцитов [1]. Прогрессия меланом опосредуется секрецией опухолевыми клетками внеклеточных везикул – покрытых мембраной структур, включающих в себя различные белки и нуклеиновые кислоты. Внеклеточные везикулы осуществляют передачу онкогенных сигналов между клетками

опухоли, а также между опухолью и окружающими ее тканями [2, 3]. Фибробласты, иммунные клетки и кератиноциты регулируют физиологию меланоцитов, а также контролируют пролиферацию, инвазию и ангиогенез меланомы за счет секреции паракринных факторов роста и межклеточной коммуникации [4, 5]. Однако в стрессовых условиях, например при фотоповреждении, кератиноциты могут секре-

тировать митогенные и провоспалительные факторы [6].

Ранее мы показали, что внеклеточные везикулы, секретлируемые клетками метастатических меланом, стимулируют рост, миграцию и стволовость нормальных кератиноцитов [7]. Процессы дифференцировки и роста нормальных кератиноцитов регулируются с участием никотинового рецептора ацетилхолина типа $\alpha 7$ ($\alpha 7$ -nAChR) [8], активация которого никотином или его производными, содержащимися в табаке (нитрозаминами), приводит к злокачественной трансформации кератиноцитов [9]. Однако возможное вовлечение $\alpha 7$ -nAChR в стимуляцию роста кератиноцитов под действием внеклеточных везикул меланом ранее не изучалось.

В настоящей работе мы впервые показали, что внеклеточные везикулы, секретлируемые клетками метастатической меланомы кожи, содержат $\alpha 7$ -nAChR на уровне мРНК и белка. При инкубации с везикулами, полученными из клеток линии mel H, наблюдались увеличение поверхностной экспрессии $\alpha 7$ -nAChR в нормальных кератиноцитах и стимуляция их роста, которые отменялись в присутствии ингибитора $\alpha 7$ -nAChR – α -бунгаротоксина (α -Bgtx). Полученные данные позволяют по-новому взглянуть на роль внеклеточных везикул метастатической меланомы и $\alpha 7$ -nAChR в злокачественной трансформации кератиноцитов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клетки метастатической меланомы кожи линий mel H, mel Kor и mel P получены от пациентов НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России (Москва, Россия) и охарактеризованы ранее [10]. Клетки выращивали в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Cytiva, Великобритания) и 1% пенициллина/стрептомицина («ПанЭко»). Для удаления эндогенных экзосом эмбриональную телячью сыворотку центрифугировали (70 мин, 120000 g), после чего фильтровали и смешивали со средой. Кератиноциты

человека Het-1A (ATCC, США) культивировали в среде BEBM (Lonza, Швейцария) как описано ранее [7]. Внеклеточные везикулы выделяли из клеток метастатической меланомы как в [7]: клетки выращивали в среде без экзосом, культуральную среду центрифугировали последовательно при 10000 g (15 мин, 4°C) и при 120000 g (70 мин, 4°C). Белковые комплексы удаляли с помощью гель-фильтрации, используя сорбент Superdex G-250 (GE Healthcare, США). Размер везикул оценивали с помощью динамического светорассеяния на приборе DynaPro Titan (Wyatt Technology, США). Экспрессию экзосомального маркера TSG101 в везикулах подтверждали Вестерн-блоттингом.

Анализ экспрессии мРНК субъединиц nAChR проводили с помощью ПЦР в реальном времени как описано ранее [7]. Анализировали экспрессию генов *CHRNA3*, *CHRNA4*, *CHRNA5*, *CHRNA7*, *CHRNA9*, *CHRNA2* и *CHRNA4* (праймеры указаны в табл. 1) на амплификаторе Roche LightCycler 96 (Roche, Швейцария). Уровень мРНК нормировали на экспрессию рРНК S18.

Наличие $\alpha 7$ -nAChR на белковом уровне во внеклеточных везикулах анализировали с помощью Вестерн-блоттинга [7]. Нитроцеллюлозные мембраны, заблокированные 5% молоком после гель-электрофореза и переноса лизатов везикул, инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами кролика против TSG101 (1:1000, ABIN2780037, Antibodies-Online, Германия) или $\alpha 7$ -nAChR (1:1000, ABIN5611363, Antibodies-Online), промывали и инкубировали с HRP-конъюгированными анти-кроличьими антителами (1 : 5000, 111-035-003, Jackson ImmunoResearch, США) в течение 1 ч при 20°C. После этого мембраны промывали и регистрировали сигнал HRP с помощью ECL-субстрата (Bio-Rad, США) с использованием хемидокументера ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare, США).

Для изучения влияния внеклеточных везикул на пролиферацию кератиноцитов клетки высевали в 96-луночные планшеты (5×10^3 клеток/луночку),

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Ген	Праймер		Ампликон, п.н.
	Прямой	Обратный	
<i>S18 SSU RNA</i>	CTC AAC ACG GGA AAC CTC AC	CGC TCC ACC AAC TAA GAA CG	110
<i>CHRNA3</i>	TGT CCC TCT CTG CTT TGT CAC	CCC AGG TTC TTG ATC GGA TGT T	169
<i>CHRNA4</i>	TCG TCC TCT ACA ACA AGT GAG	GGT CCA GGA GCC GAA TTT CA	199
<i>CHRNA5</i>	CGT CTG GTT GAA ACA GGA ATG G	ACA GTG CCA TTG TAC CTG ATG A	185
<i>CHRNA7</i>	TTT ACA GTG GAA TGT GTC AGA	TGT GGA ATG TGG CGT CAA G	88
<i>CHRNA9</i>	GGA GGC CAG ACA TCG TCT TA	CAC TGC TGG TTG TCA AAA GGG	168
<i>CHRNA2</i>	ATC TCC TGG ATC CTT CCC GC	AGA AGG ACA CCT CGT ACA TGC C	290
<i>CHRNA4</i>	CGC CTT CCC TGG TCC TTT TC	TGT TCA CAC CCT CGT AGC GG	381

через 24 ч к ним добавляли везикулы (50 мкг/мл по общему белку) и/или 10 мкМ α -бунгаротоксина (α -Bgtx, – ингибитор $\alpha 7$ -nAChR, Tocris, Великобритания) и дополнительно инкубировали в течение 72 ч без смены среды. Концентрация общего везикулярного белка соответствовала таковой в плазме крови онкологических больных (20–100 мкг/мл) [7]. Жизнеспособность клеток анализировали с использованием колориметрического теста WST-1 (Santa Cruz, США) [11]. Данные нормировали на усредненные показания контрольных лунок с необработанными клетками.

Влияние везикул и α -Bgtx на экспрессию $\alpha 7$ -nAChR в кератиноцитах исследовали после окрашивания клеток TRITC-меченым α -Bgtx (Sigma-Aldrich, США) с помощью проточного цитофлуориметра Attune NxT (Life Technologies, США) как описано ранее [11]. Медиану флуоресценции нормировали на аутофлуоресценцию неокрашенных клеток.

Корреляцию уровня экспрессии *CHRNA7* у пациентов с метастатической меланомой из базы данных TCGA (исследование SKCM) с их выживаемостью анализировали при помощи программы Xena [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Внеклеточные везикулы, секретируемые клетками меланомы, содержат микроРНК, мРНК и белки, способствующие усилению пролиферации, миграции и стволовости нормальных кератиноцитов [7]. Однако вопрос о включении nAChR, регулирующих многие онкогенные процессы в эпителиальных клетках, в со-

став внеклеточных везикул ранее не исследовали.

Методом ПЦР в реальном времени мы впервые показали, что внеклеточные везикулы, секретируемые клетками метастатической меланомы линий mel H, mel Kor и mel P, полученных от пациентов, содержат мРНК *CHRNA7*, кодирующую субъединицу гомопентамерного рецептора $\alpha 7$ -nAChR (рис. 1А). Наибольший уровень *CHRNA7* содержали везикулы, секретируемые клетками mel H. При этом не обнаружены мРНК, кодирующие $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 9$, $\beta 2$ и $\beta 4$ -субъединицы nAChR. С помощью Вестерн-блоттинга подтвердили присутствие белка $\alpha 7$ -nAChR в составе везикул, секретируемых клетками всех исследованных в работе линий метастатической меланомы (рис. 1Б). Примечательно, что ранее проведенный анализ белкового состава внеклеточных везикул, секретируемых первичными меланомами, не выявил в них $\alpha 7$ -nAChR [3]. Возможно, экспрессия этого рецептора может быть специфическим свойством внеклеточных везикул метастатической меланомы.

Ранее мы показали, что внеклеточные везикулы, секретируемые клетками метастатической меланомы mel P, содержат мРНК, кодирующую рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), и инкубация нормальных кератиноцитов с этими везикулами приводит к увеличению экспрессии EGFR на поверхности кератиноцитов и стимуляции их пролиферации [7]. В данной работе мы изучили влияние внеклеточных везикул метастатической меланомы mel H, mel Kor и mel P на экспрессию $\alpha 7$ -nAChR в нормальных кератиноцитах. С помощью проточной цитофлуориметрии установлено, что только инкубация

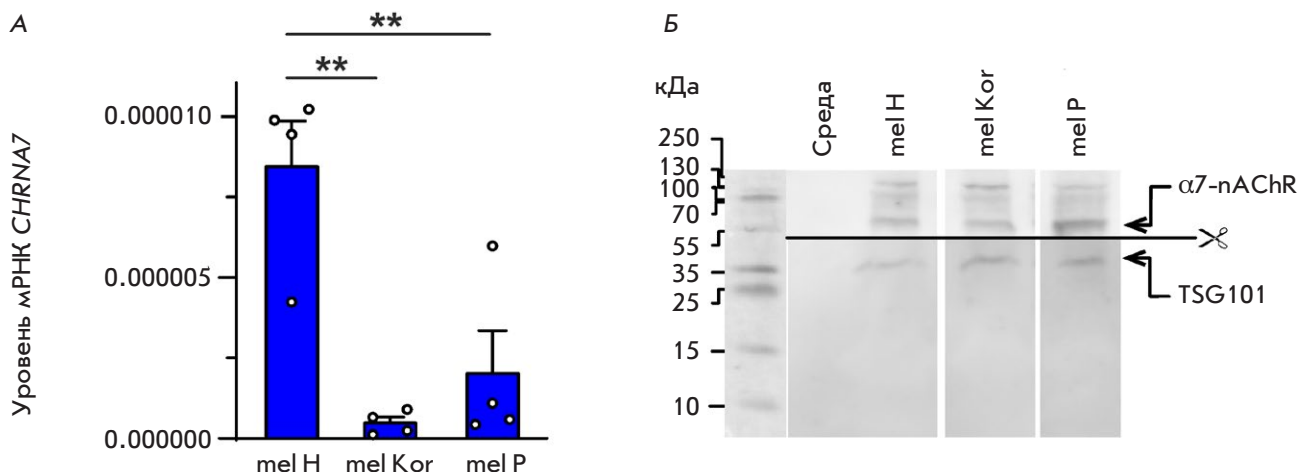
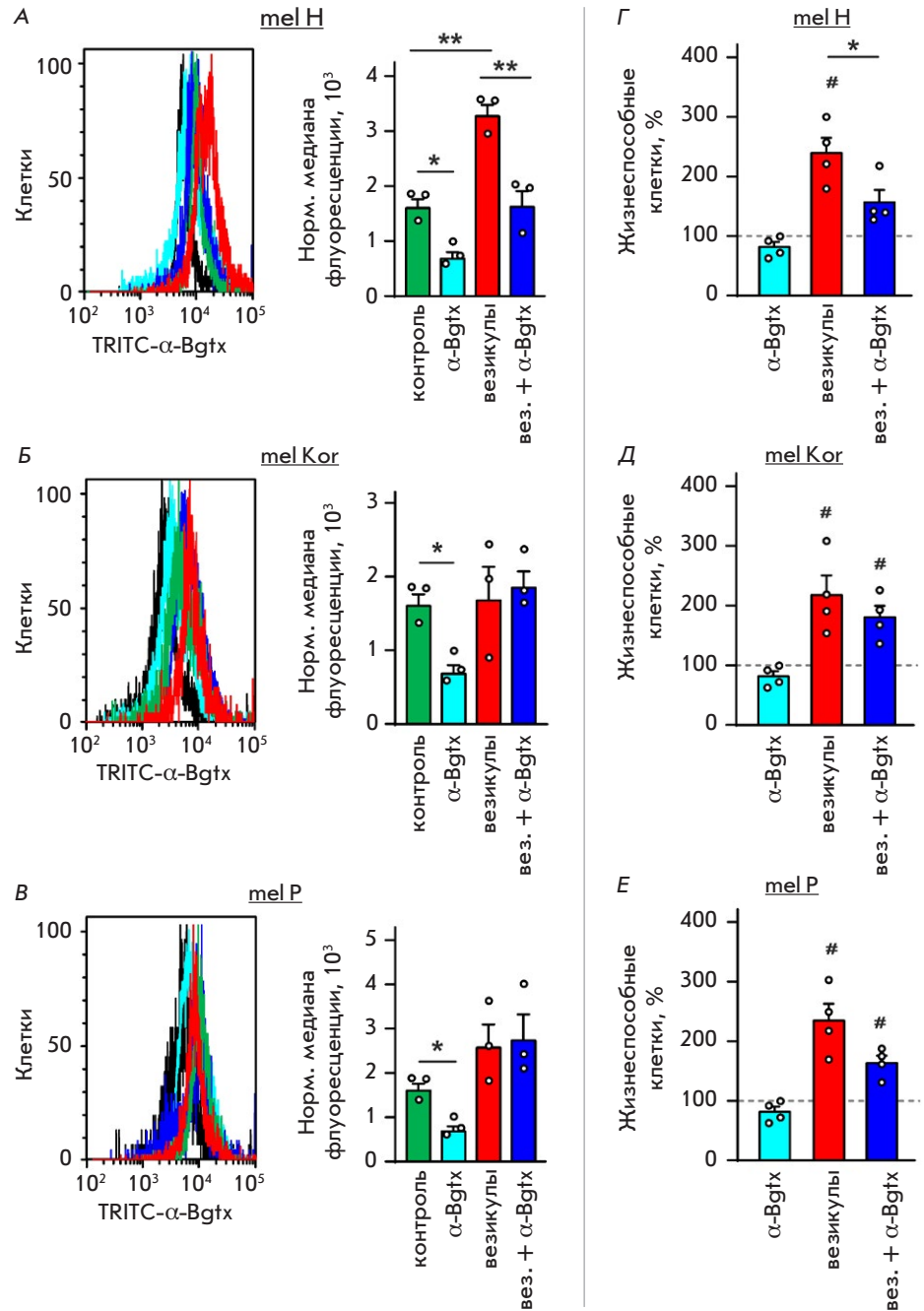


Рис. 1. Анализ экспрессии $\alpha 7$ -nAChR в везикулах, секретируемых клетками метастатической меланомы. А – анализ экспрессии гена *CHRNA7* в везикулах клеток линий mel H, mel Kor и mel P. Данные ПЦР в реальном времени нормированы на экспрессию мРНК *S18* и приведены как среднее \pm средноквадратичная ошибка ($n = 4$). ** ($p < 0.01$) означает статистически значимое отличие групп данных согласно тесту One-way ANOVA/Tukey. Б – анализ содержания $\alpha 7$ -nAChR в везикулах клеток mel H, mel Kor и mel P с помощью Вестерн-блоттинга. Белок TSG101 использовали в качестве экзосомального маркера

Рис. 2. Анализ влияния везикул, секретируемых клетками метастатической меланомы, и α -Bgtx на экспрессию α 7-nAChR и пролиферацию кератиноцитов. А–В – экспрессия α 7-nAChR на поверхности нормальных кератиноцитов, инкубированных с внеклеточными везикулами клеток линий mel H (А), mel Kor (Б) и mel P (В) и/или α -Bgtx. Данные приведены как нормализованная медиана флуоресценции \pm среднеквадратичная ошибка ($n = 3$). * ($p < 0.05$) и ** ($p < 0.01$) означают статистически значимые различия между группами данных согласно тесту One-way ANOVA/Tukey. Г–Е – влияние везикул клеток линий mel H (Г), mel Kor (Д) и mel P (Е) и/или α -Bgtx на пролиферацию нормальных кератиноцитов. Данные представлены как % от контроля (необработанные клетки, пунктирная линия) \pm среднеквадратичная ошибка ($n = 4$). # ($p < 0.05$) означает значимое отличие от контроля согласно One-sample *t*-тесту. * ($p < 0.05$) означает достоверное различие между группами данных согласно тесту One-way ANOVA/Tukey



с внеклеточными везикулами клеток mel H вызывает достоверное увеличение экспрессии α 7-nAChR на поверхности нормальных кератиноцитов. Обработка кератиноцитов везикулами mel Kor и mel P не влияла на уровень экспрессии рецептора (рис. 2А–В). Полученные результаты находятся в соответствии с данными ПЦР, согласно которым наибольший уровень экспрессии гена *CHRNA7* наблюдается именно в везикулах клеток mel H (рис. 1А). Возможно, везикулы клеток метастатической меланомы линии mel H переносят мРНК, кодирующую α 7-nAChR, в кератиноциты, увеличивая таким образом экспрессию

этого рецептора в нормальных клетках. Интересно отметить, что инкубация с ингибитором α 7-nAChR – α -Bgtx, приводила к снижению экспрессии этого рецептора на поверхности кератиноцитов (рис. 2А–В) как в присутствии везикул mel H, так и в их отсутствии, что подтверждает существование положительной обратной связи между активностью рецептора и его экспрессией.

Инкубация с везикулами клеток mel H, mel Kor и mel P во всех случаях приводила к значительному увеличению числа жизнеспособных кератиноцитов (рис. 2Г–Е). Однако только везикулы mel H

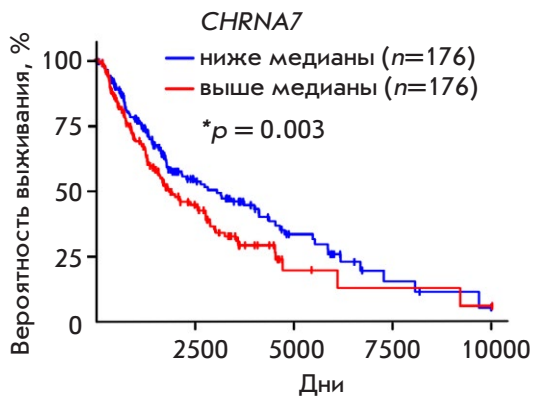


Рис. 3. Биоинформатический анализ корреляции выживаемости пациентов с метастатической меланомой с уровнем экспрессии *CHRNA7*. Пациентов делили на две группы – с уровнем экспрессии гена выше и ниже медианного значения. Статистический анализ выживаемости пациентов проводили по методу Каплана–Мейера с помощью log-rank теста

вызывали отмену митогенного эффекта в присутствии α -Vgtx, что коррелирует с отсутствием изменения экспрессии $\alpha 7$ -nAChR в кератиноцитах под действием везикул mel Kor и mel P (рис. 2Б,В). Примечательно, что инкубация с α -Vgtx в отсутствие везикул не приводила к существенному снижению числа жизнеспособных кератиноцитов (рис. 2Г–Е), несмотря на значительное снижение экспрессии рецептора под действием токсина (рис. 2А–В). Это указывает на то, что рост кератиноцитов в нормальных условиях не зависит от регуляции $\alpha 7$ -nAChR, но перенос везикулами mel H гена *CHRNA7* приводит к значительному увеличению экспрессии рецептора в кератиноцитах и, как следствие, к дополнительной стимуляции их пролиферации. Видимо, несмотря на сравнимую экспрессию $\alpha 7$ -рецептора во всех типах исследованных везикул (рис. 1Б), именно мРНК *CHRNA7* является основным переносимым компонен-

том, обеспечивающим усиление роста кератиноцитов под влиянием везикул. При этом, увеличение пролиферации кератиноцитов при инкубации с везикулами mel Kor и mel P, вероятно, происходит за счет других факторов, не связанных с $\alpha 7$ -nAChR, например таких, как мРНК EGFR [7].

Чтобы понять, как уровень экспрессии *CHRNA7* может влиять на развитие онкогенных процессов и, в частности, коррелировать со злокачественностью клеток, мы провели биоинформатический анализ экспрессии этого рецептора в образцах биопсии пациентов с метастатической меланомой кожи. Анализ по Каплану–Мейеру показал, что повышенная экспрессия *CHRNA7* связана с неблагоприятным прогнозом выживаемости пациентов (рис. 3). Полученные данные свидетельствуют, что $\alpha 7$ -nAChR, возможно, вовлечен в патогенез метастатической меланомы и перенос мРНК этого рецептора в составе внеклеточных везикул может представлять собой один из механизмов стимуляции прогрессии опухоли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В составе внеклеточных везикул, секретлируемых клетками метастатической меланомы разных линий, впервые обнаружена экспрессия $\alpha 7$ -nAChR на уровне как мРНК, так и белка. Показано, что внеклеточные везикулы клеток mel H, демонстрирующие наибольшую экспрессию *CHRNA7*, переносят мРНК рецептора в нормальные кератиноциты, увеличивая экспрессию $\alpha 7$ -nAChR на их поверхности и стимулируя их рост. Отмена эффекта везикул mel H в присутствии α -Vgtx указывает на перспективность таргетирования $\alpha 7$ -nAChR для контроля злокачественной трансформации нормальных кератиноцитов. ●

Работа выполнена при поддержке РФФ (проект № 17-74-20161).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dratkiewicz E., Simiczjew A., Mazurkiewicz J., Ziętek M., Matkowski R., Nowak D. // *Cells*. 2021. V. 10. № 4. P. 862.
2. Tucci M., Mannavola F., Passarelli A., Stucci L.S., Cives M., Silvestris F. // *Oncotarget*. 2018. V. 9. № 29. P. 20826–20837.
3. Boussadia Z., Lamberti J., Mattei F., Pizzi E., Puglisi R., Zanetti C., Pasquini L., Fratini F., Fantozzi L., Felicetti F., et al. // *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2018. V. 37. № 1. P. 245.
4. Falcone I., Conciatori F., Bazzichetto C., Ferretti G., Cognetti F., Ciuffreda L., Milella M. // *Cancers (Basel)*. 2020. V. 12. № 10. P. 2870.
5. Villanueva J., Herlyn M. // *Curr. Oncol. Rep*. 2008. V. 10. № 5. P. 439–446.
6. Hachiya A., Kobayashi A., Yoshida Y., Kitahara T., Takema Y., Imokawa G. // *Am. J. Pathol*. 2004. V. 165. № 6. P. 2099–2109.
7. Bychkov M.L., Kirichenko A.V., Mikhaylova I.N., Paramonov A.S., Yastremsky E.V., Kirpichnikov M.P., Shulepko M.A., Lyukmanova E.N. // *Biomedicines*. 2022. V. 10. № 3. P. 660.
8. Shulepko M., Bychkov M., Kulbatskii D., Lyukmanova E. // *Rus. J. Bioorg. Chem*. 2019. V. 45. № 2. P. 66–75.
9. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Grando S.A. // *Life Sci*. 2007. V. 80. № 24–25. P. 2243–2247.
10. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю., Морозова Л.Ф., Бурова О.С., Панкина Т.Н., Козлов А.М., Голубева В.А., Черемушкин Е.А., Дорошенко М.Б., Демидов Л.В., Киселев С.Л., Ларин С.С., Георгиев Г.П. // *Вестник РАМН*. 2005. Т. 7. С. 37–40.
11. Lyukmanova E., Bychkov M., Sharonov G., Efremenko A., Shulepko M., Kulbatskii D., Shenkarev Z., Feofanov A., Dolgikh D., Kirpichnikov M. // *Br. J. Pharmacol*. 2018. V. 175. № 11. P. 1973–1986.
12. Goldman M.J., Craft B., Hastie M., Repečka K., McDade F., Kamath A., Banerjee A., Luo Y., Rogers D., Brooks A.N., et al. // *Nat. Biotechnol*. 2020. V. 38. № 6. P. 675–678.