

На правах рукописи

ХРОМОВА Наталья Викторовна

**ВЛИЯНИЕ НАРУШЕНИЙ ФУНКЦИИ ОПУХОЛЕВОГО
СУПРЕССОРА p53 НА ВАСКУЛЯРИЗАЦИЮ ОПУХОЛЕЙ:
ИДЕНТИФИКАЦИЯ НЕИЗВЕСТНЫХ РАНЕЕ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ
И МЕХАНИЗМОВ**

Специальность 14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

МОСКВА

2010

Работа выполнена в лаборатории цитогенетики НИИ Канцерогенеза Учреждения Российской академии медицинских наук Российский онкологический научный центр имени Н. Н. Блохина РАМН (директор – академик РАН и РАМН, д.м.н., проф. М. И. Давыдов)

Научный руководитель:

Доктор биологических наук,
профессор

Копнин Борис Павлович

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук,
профессор

Лазаревич Наталия Леонидовна

Доктор биологических наук,
профессор

Народицкий Борис Савельевич

Ведущая организация:

Гематологический научный центр
Минздравсоцразвития РФ

Защита диссертации состоится «___» _____ 2010 года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д.001.017.01 РОНЦ имени Н.Н.Блохина РАМН по адресу: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке РОНЦ им. Н. Н.Блохина РАМН.

Автореферат разослан «___» _____ 2010 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
д.м.н., профессор

Ю.В. Шишкин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Васкуляризация – образование сосудов и сосудоподобных структур, обеспечивающих кровоснабжение и дренирование опухолевых тканей, – необходимое условие для прогрессивного роста новообразований. Неопластические клетки обладают способностью индуцировать гемангиогенез и лимфангиогенез – процессы формирования новых мелких кровеносных и лимфатических сосудов. Механизмы опухолевого гемангиогенеза активно исследовались в последние годы. Согласно общепринятым в настоящее время представлениям новая сосудистая сеть в основном образуется за счет ветвления сосудов окружающих нормальных тканей и их врастания в опухоль. Этот процесс стимулируется опухолевыми клетками путем секреции ими ряда проангиогенных факторов, важнейшими из которых являются факторы роста эндотелия VEGF-A и VEGF-B. Индукция лимфангиогенеза исследована значительно хуже. Предполагается, что его стимуляция осуществляется главным образом за счет секреции опухолевыми клетками других цитокинов семейства VEGF: VEGF-C и VEGF-D, которые связываются с рецептором лимфатического эндотелия VEGFR-3.

Механизмы, ответственные за ангиогенную активность опухолевых клеток и, в частности, за повышенную продукцию ими различных факторов роста семейства VEGF, изучены довольно плохо. До недавнего времени исследования цитокинов семейства VEGF были сосредоточены на их функциях как паракринных стимуляторов ангиогенеза. В последнее время появляются данные, что VEGF-C, подобно VEGF-A, может принимать участие и в аутокринной регуляции размножения и миграции неопластических клеток, хотя механизмы увеличения экспрессии рецепторов этих факторов в самих опухолевых клетках изучены плохо.

На протяжении многих лет опухолевая васкуляризация рассматривалась только как прорастающий гемангиогенез. В последние годы были обнаружены новые механизмы кровоснабжения, которые могут быть задействованы одновременно в одной опухоли, либо преобладать в определенном типе новообразований. Один из таких механизмов – васкулогенная мимикрия – явление, при котором неопластическими клетками формируются каналы, соединяющиеся с истинными сосудами и обеспечивающие дополнительное кровоснабжение опухолевой ткани. В состав таких каналов не входят эндотелиальные клетки, и поэтому опухоли с развитой сетью мимикрических структур устойчивы к антиангиогенной терапии. В последние годы все больше накапливается данных об участии

васкулогенной мимикрии в кровоснабжении различных новообразований, однако вопрос о механизмах формирования неопластическими клетками сосудоподобных структур до сих пор остается открытым. Имеются лишь отдельные данные, что к индукции этого процесса может приводить экспрессия неопластическими клетками белков VE-кадгерина, Mig-7 и VEGF-C.

В настоящее время не вызывает сомнения участие в индукции опухолевого гемангиогенеза нарушений функции опухолевого супрессора p53 – наиболее универсального молекулярного изменения в различных новообразованиях человека. Известно, что потеря экспрессии p53, контролирующего продукцию многих проангиогенных факторов и ингибиторов гемангиогенеза, может усиливать опухолевый гемангиогенез. Однако не были исследованы последствия миссенс-мутаций в гене p53, которые значительно чаще, чем полная потеря экспрессии p53, обнаруживаются в различных новообразованиях человека, в том числе и в широко распространенных – раке легкого, раке ободочной кишки и др. Кроме того, совершенно не изучен вопрос о вкладе нарушений функции p53 в другие механизмы опухолевой васкуляризации – васкулогенную мимикрию и лимфангиогенез. Ответы на эти вопросы должны углубить знания о механизмах прогрессии опухолей, что, в свою очередь, может привести к разработке новых способов направленной терапии онкологических заболеваний.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось изучение влияния различных нарушений функции опухолевого супрессора p53 в клетках рака ободочной кишки и рака легкого человека на гемангиогенез, васкулогенную мимикрию и лимфангиогенез в формируемых ими опухолевых тканях.

Для достижения поставленной цели были выдвинуты следующие задачи:

1. Изучить влияние синтеза мутантных белков p53 и гомозиготного нокаута гена p53 на гемангиогенез и скорость роста ксенографтов рака ободочной кишки человека линии НСТ116 в бестимусных мышцах.

2. Исследовать воздействие нарушений функции p53 на васкулогенную мимикрию в ксенографтах НСТ116 и на экспрессию ряда потенциальных ее регуляторов – генов *VEGFC*, *MIG-7* и *VE-кадгерина*.

3. Изучить влияние наиболее распространенных нарушений p53 на лимфангиогенез в ксенографтах НСТ116 и А549.

4. Изучить последствия подавления продукции VEGF-C на биологические свойства опухолевых клеток HCT116 и A549 в культурах *in vitro*: скорость размножения и миграционную активность.

5. Изучить последствия подавления продукции VEGF-C на гемангиогенез, лимфангиогенез и васкулогенную мимикрию в опухолях, образуемых клетками A549 и HCT116 с различным статусом p53.

Научная новизна и практическая значимость исследования

Обнаружено неизвестное ранее влияние мутаций в гене опухолевого супрессора p53 на выраженность разных типов васкуляризации опухолей – гемангиогенез, васкулогенную мимикрию и лимфангиогенез. Выявлена ключевая роль повышения внутриклеточного уровня активных форм кислорода (АФК) и активируемого ими сигнального пути HIF1/VEGF-A в индукции гемангиогенеза и стимуляции опухолевого роста, вызываемыми различными нарушениями функции опухолевого супрессора p53. Продемонстрировано ингибирующее действие антиоксиданта NAC на гемангиогенез и рост опухолей с дисфункцией p53. Впервые установлено, что нарушения функции p53 в клетках рака ободочной кишки человека приводят к изменению экспрессии гена *VEGFC*. Показано, что подавление продукции цитокина VEGF-C вызывает ряд эффектов, ингибирующих опухолевую прогрессию: торможение пролиферации и миграции неопластических клеток, уменьшение способности к васкулогенной мимикрии и снижение лимфангиогенной активности, что указывает на перспективность использования VEGF-C в качестве молекулярной мишени для направленной терапии немелкоклеточного рака легкого и рака ободочной кишки человека.

Апробация работы

Диссертация апробирована и рекомендована к защите 16 июня 2010 года на совместной научной конференции лабораторий цитогенетики, генетики опухолевых клеток, регуляции клеточных и вирусных онкогенов, механизмов прогрессии эпителиальных опухолей и молекулярной эндокринологии НИИ Канцерогенеза РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 4 статьи опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК МОН РФ соискателям ученой степени кандидата биологических наук.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста, содержит 40 рисунков, 5 таблиц. Состоит из глав: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты исследования», «Обсуждение полученных результатов», «Выводы», «Список литературы». Список литературы содержит 205 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы следующие методы исследования: молекулярное клонирование, трансдукция лентивирусных векторов, полимеразная цепная реакция (ПЦР), анализ белков с помощью вестерн-блот гибридизации, анализ динамики роста клеток, анализ «зарастания раны» клеточными линиями *in vitro*, тест на миграцию клеток в камере Бойдена, анализ динамики роста ксенографтов в бестимусных мышах, иммуногистохимический анализ срезов опухолевых тканей, статистическая обработка данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Роль нарушений p53 в васкуляризации опухолей

1.1. Клеточные линии, использованные для изучения опухолевого гемангиогенеза

Для изучения влияния нарушений опухолевого супрессора p53 на опухолевый гемангиогенез создан набор стабильных клеточных сублиний производных линии рака ободочной кишки человека HCT116/p53+/+ и ее сублинии HCT116/p53-/- с гомозиготным нокаутом гена p53, синтезирующих экзогенные мутантные белки p53 с аминокислотными заменами в горячих точках мутаций, наиболее характерных для опухолей человека (Табл. 1, Рис. 1).

Табл. 1. Сублинии HCT116 с нарушениями p53.

Мутантные формы p53	Клеточная линия	
	HCT116/p53+/+	HCT116/p53-/-
«Пустой» вектор pL6 (контроль)	экспрессия p53 дикого типа	полная потеря экспрессии p53
Мутант R175H (кодон 175: аргинин→гистидин)	одновременная экспрессия белков дикого типа и мутантного p53	экспрессия только мутантного p53
Мутант R248W (кодон 248: аргинин→триптофан)		
Мутант R273H (кодон 273: аргинин→гистидин)		

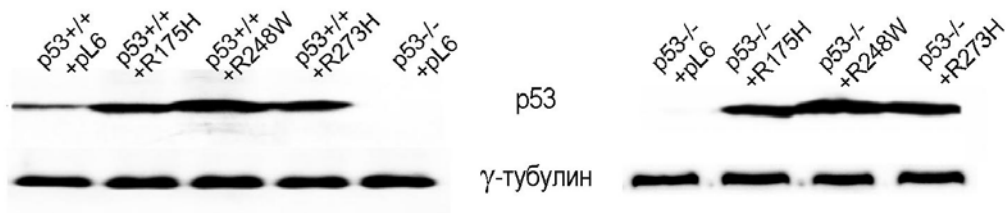


Рис. 1. Вестерн блот-анализ экспрессии p53 в культурах клеток НСТ116.

Представлены типичные результаты одного из трех экспериментов. Белок γ -тубулин использовали как контроль количества нанесенных образцов.

Таким образом, был создан набор сублиний клеток НСТ116, имитирующих практически все возможные ситуации нарушений p53, наблюдаемые при раках толстой кишки.

1.2. Влияние нарушений p53 на размножение клеток НСТ116 *in vitro*, *in vivo* и их ангиогенную активность

В начале этого раздела исследований нами была поставлена задача: изучить влияние наиболее характерных для опухолей человека мутаций опухолевого супрессора p53 на опухолевый рост и гемангиогенез.

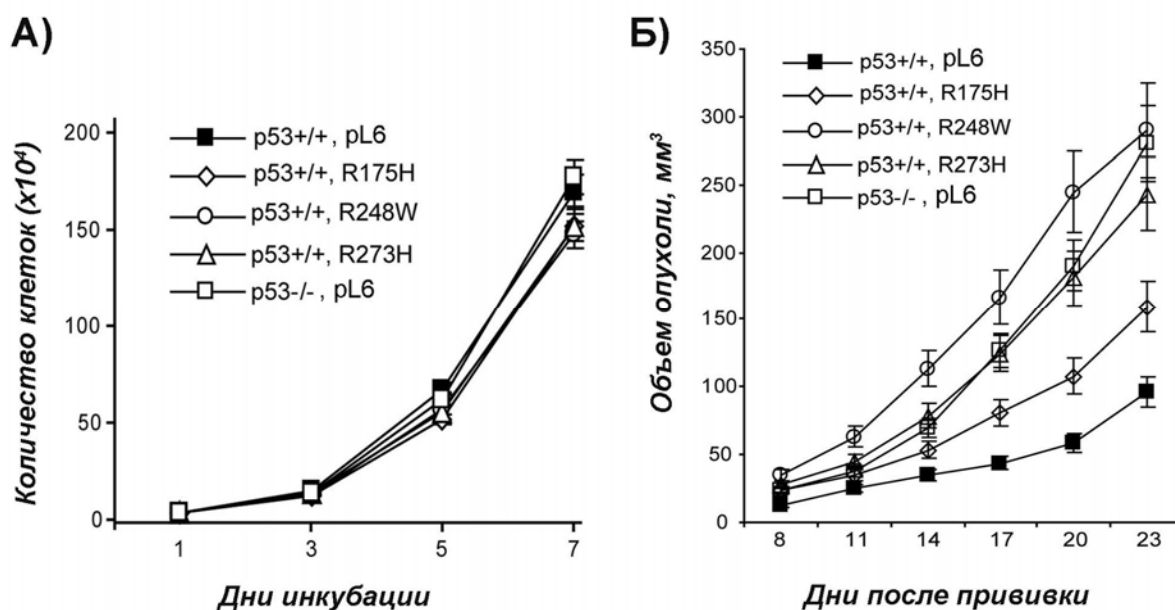


Рис. 2. Влияние экспрессии мутантных белков p53 в клетках НСТ116 и нокаута гена p53 на скорость роста клеточных культур *in vitro* (А) и подкожных опухолей *in vivo* (Б).

А) Скорость роста сублиний НСТ116/p53+/+ *in vitro*. Каждая точка – средние величины для 3-х лунок.

Б) Скорость роста ксенографтов НСТ116 с различными вариантами экспрессии p53. Приведены средние значения, полученные при анализе 8–12 опухолей в каждом из трех экспериментов.

Синтез экзогенных мутантных белков p53 не влиял на скорость роста клеточных культур *in vitro* (Рис. 2А), но при этом сопровождался ускорением роста опухолей, формируемых клетками НСТ116/p53+/+ при подкожной прививке бестимусным мышам (Рис. 2Б). Наибольшую скорость роста демонстрировали опухолевые ксенографты, синтезирующие экзогенные мутанты p53 R248W и R273H. Трансдукция R175H мутанта p53 вызывала меньший, но также статистически значимый эффект. В то же время трансдукция мутантных p53 в клетки НСТ116/p53-/-, не экспрессирующих эндогенный p53, существенно не влияла на опухолевый рост, что указывает на ключевую роль доминантно-негативных, а не вновь приобретенных (gain-of-function) активностей мутантных p53 в стимуляции роста подкожных ксенографтов рака ободочной кишки линии НСТ116.

Увеличенная скорость роста клеток НСТ116/p53+/+, синтезирующих мутантные белки p53, в условиях *in vivo*, но не *in vitro*, наводила на мысль, что такое влияние на рост опухолей может быть связано с их более эффективной васкуляризацией, которая является важным лимитирующим фактором в развитии новообразований. Ангиогенная активность неопластических клеток определялась путем подсчета числа кровеносных сосудов в опухолевых тканях, выявляемых с помощью иммуногистохимического окрашивания парафиновых срезов антителами к CD34 –маркеру эндотелия кровеносных сосудов. При этом подсчитывались разные типы сосудов: с просветами (потенциально функциональные), крупные (на гистологических препаратах >100мкм при увеличении ×100) и сосуды без просветов (вероятно недоразвитые). Анализ срезов ксенографтов показал, что в опухолях, не экспрессирующих эндогенный p53, или экспрессирующих наряду с эндогенным p53 трансдуцированные мутантные p53, происходит значительное увеличение количества функционирующих сосудов, т.е. относительно крупных и сосудов с просветами. Особенно сильно (до 4,5 раз) увеличивалось количество относительно крупных сосудов. Следует заметить, что наибольшая эффективность васкуляризации (число сосудов >100 мкм) обнаружена в ксенографтах НСТ116/p53+/+, экспрессирующих p53 R248W. Кроме этого, мы использовали еще один показатель эффективности васкуляризации опухоли, выражающийся в количестве сосудов без просветов, которые могут представлять собой недоразвитые сосуды. Так, было обнаружено, что нарушение функционирования p53 сопровождается уменьшением количества мелких сосудов без просветов (Рис.3, Табл.2).

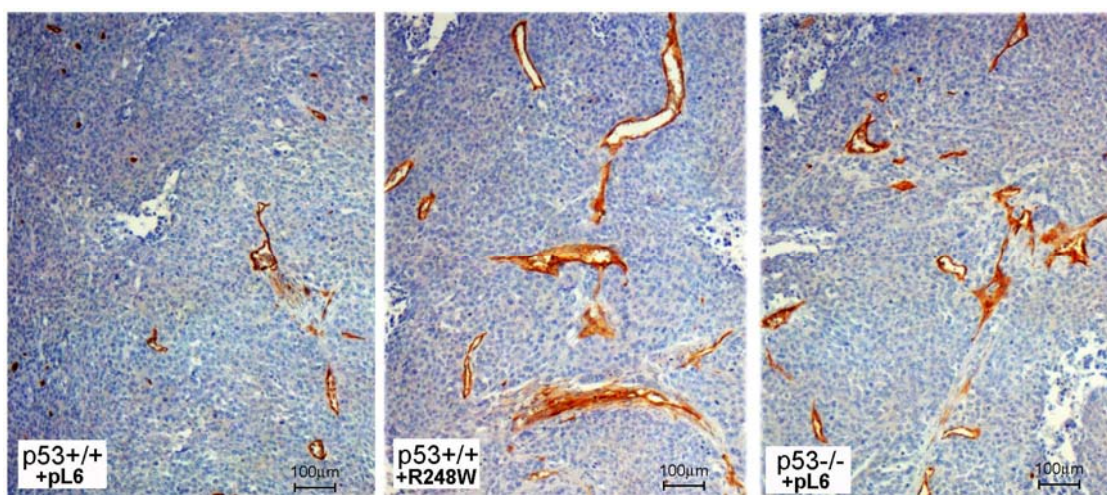


Рис. 3. Иммуногистохимическое окрашивание срезов опухолей НСТ116 с различным статусом p53 антителами к CD34.

Экспрессия мутантных p53, также как и потеря экспрессии p53, увеличивает число CD34-позитивных структур в опухолевых тканях. Представлены типичные поля зрения для каждой экспериментальной группы. Увеличение $\times 100$.

Табл. 2. Влияние статуса p53 на количество CD34-позитивных структур.

	p53+/+ (контроль)	p53+/+ + R175H	p53+/+ + R248W	p53+/+ + R273H	p53-/-
Сосуды с просветами	6.9 \pm 0.7	10.2 \pm 0.9*	12,9 \pm 1.1**	10.9 \pm 0.8*	14.2 \pm 1.0**
Крупные сосуды (>100мкм)	1.1 \pm 0.1	3.2 \pm 0.3*	5.7 \pm 0.6**	2.9 \pm 0.3*	3.8 \pm 0.4**
Сосуды без просветов	8.2 \pm 0.9	5.5 \pm 0.7*	5.4 \pm 0.6*	5.7 \pm 0.5*	5.4 \pm 0.4*

Различия между значениями в контрольной и экспериментальных группах достоверны по критерию Стьюдента; * p < 0,05, **p < 0,01.

1.3. Влияние нарушений p53 на уровень АФК и синтез HIF-1 α

Основываясь на данных, что потеря функции p53 ослабляет антиоксидантную защиту [Sablina *et al.*, 2005], а увеличение внутриклеточного уровня активных форм кислорода (АФК) может приводить к активации сигнального пути HIF1/VEGF-A [Xia *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007], было решено проверить, связана ли стимуляция опухолевого гемангиогенеза при экспрессии мутантных p53 с изменением уровня активных форм кислорода (АФК). Было обнаружено, что экспрессия всех

изучаемых мутантов p53 индуцировала примерно двукратное увеличение уровня АФК в клетках НСТ116/p53+/+ (Рис. 4).

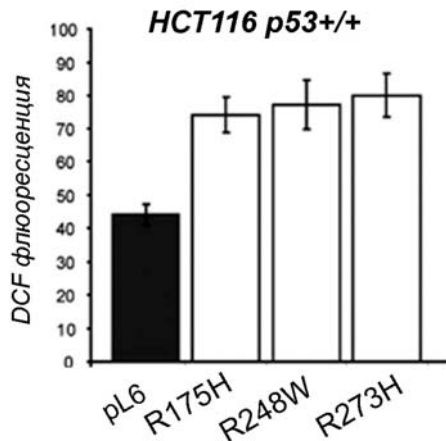


Рис. 4. Влияние экспрессии мутантных p53 на уровень АФК в клетках НСТ116/p53+/+.

Средние значения суммарной флуоресценции DCF в 10^4 клеток в двух экспериментах. Различия между контрольными клетками и сублиниями, экспрессирующими мутантные p53, статистически достоверны по критерию Стьюдента ($p < 0,01$).

Для ответа на вопрос, ведет ли повышение уровня АФК в клеточных культурах, экспрессирующих мутантные p53, к увеличению содержания в них транскрипционного фактора HIF1- α был проведен Вестерн-блот анализ этого белка.

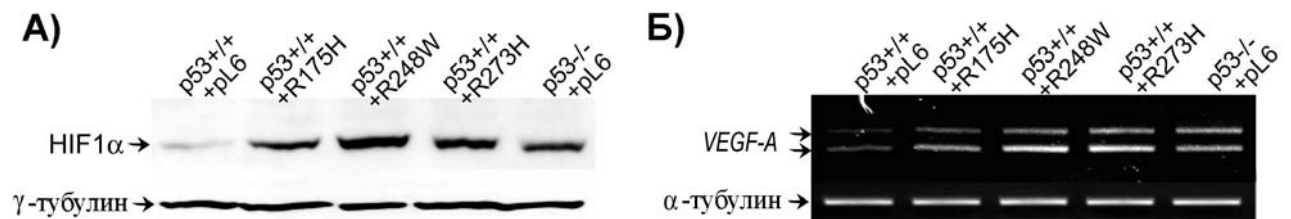


Рис. 5. Влияние экспрессии мутантных p53 в клетках НСТ116/p53+/+ и нокаута гена p53 на содержание HIF1- α (А) и уровень мРНК VEGFA (Б).

А) Вестерн блот-анализ экспрессии HIF1- α . Белок γ -тубулин использовали как контроль количества нанесенных образцов. Б) Результаты ОТ-ПЦР анализа уровня мРНК VEGFA. мРНК α -тубулина использовали как контроль количества нанесенных образцов.

Полученные данные указывают на существенное увеличение содержания HIF-1 α в сублиниях НСТ116/p53+/+, экспрессирующих мутанты p53 (Рис. 5А). Увеличение продукции HIF1- α в таких клетках коррелирует с повышением экспрессии его гена-мишени VEGFA. Полуколичественный ОТ-ПЦР анализ показал увеличение уровня мРНК VEGFA₁₂₁ и VEGFA₁₆₅ – продуктов альтернативного сплайсинга гена VEGFA (Рис. 5Б).

1.4. Влияние антиоксиданта NAC на уровень АФК, HIF1- α и гемангиогенез

На следующем этапе этой части работы было исследовано воздействие антиоксиданта N-ацетил-L-аспартата (NAC) на анализируемые культуры

клеток и образуемые ими опухоли, который, из общих соображений, должен подавлять АФК-зависимую стимуляцию гемаангиогенеза. В экспериментах *in vitro* было показано, что добавление в среду 5мМ NAC на 12 часов снижает уровень АФК в клетках с дисфункцией p53 примерно в 1,5 раза, делая его сопоставимым с наблюдаемым в контрольных клетках (Рис. 6А). Подавление АФК приводит к примерно двукратному снижению содержания белка HIF1- α в клетках с трансдуцированными мутантными белками p53 или гомозиготным нокаутом гена p53 (Рис. 6Б).

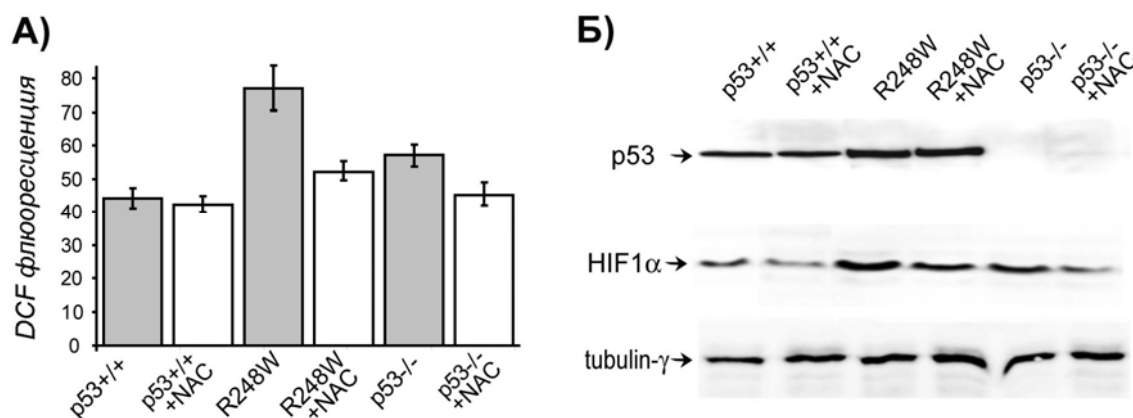


Рис. 6. Влияние антиоксиданта NAC (5 мМ, 12 час.) на уровень АФК (А) и содержание HIF1- α (Б) в клеточных линиях НСТ116 с измененной функцией p53.

А) Средние значения суммарной флюоресценции DCF в 10^4 клеток в двух экспериментах. Различия между контрольными клетками с дисфункцией p53 и клетками, обработанными NAC, достоверны по критерию Стьюдента ($p < 0,05$). **Б)** Вестерн блот-анализ продукции HIF1- α . Белок γ -тубулин использовали как контроль количества нанесенных образцов.

Иммуногистохимическое окрашивание срезов опухолей у бестимусных мышей, получавших NAC, показало, что снижение внутриклеточного уровня АФК вызывает уменьшение синтеза HIF1- α *in vivo*, что сопровождается подавлением опухолевого гемаангиогенеза и, как следствие, существенным подавлением скорости роста опухолевых ксенографтов (Рис. 7). Так, NAC-индуцированное торможение скорости роста опухолей наблюдалось только при нарушениях функции p53, тогда как в опухолях НСТ116, несущих оба аллеля p53 дикого типа, этот эффект выражен незначительно (Рис. 7А).

NAC-индуцированное подавление гемаангиогенеза в опухолевых ксенографтах, формируемых клетками НСТ116 с дисфункцией p53, выражается как в уменьшении количества функционирующих кровеносных сосудов, так и в увеличении числа недоразвитых капилляров без просветов (Рис. 7Б). Наибольший эффект NAC на рост крупных сосудов наблюдается в

опухолях, экспрессирующих контактные мутанты p53 R248W и R273H, а также в опухолях с нокаутом гена p53.

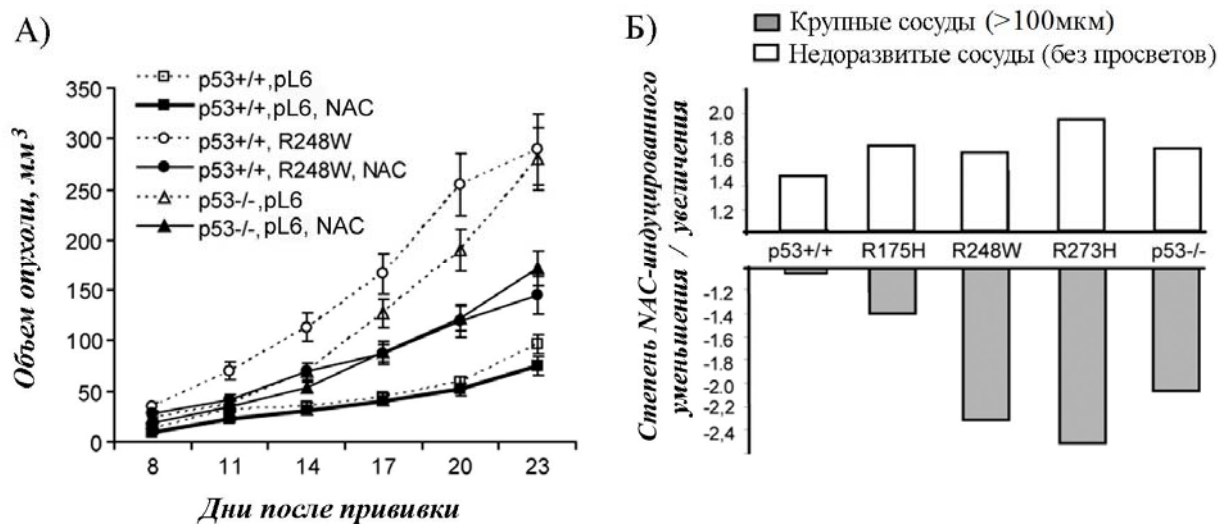


Рис. 7. Влияние антиоксиданта NAC на скорость роста подкожных ксенографтов (А) и опухолевый гемангиогенез (Б).

А) Влияние NAC на скорость роста ксенографтов НСТ116 с разным статусом p53. Различия между объемами контрольных и NAC-обработанных опухолей с нарушениями p53 достоверны по критерию Стьюдента ($p < 0,01$). Б) Влияние NAC на количество крупных и недоразвитых сосудов в опухолях. Значения представлены как отношение среднего количества сосудов в опухолях, формируемых у мышей, получавших NAC, к среднему количеству сосудов в опухолях контрольной группы.

Таким образом, проведенные в этой части работы эксперименты позволили продемонстрировать, что экспрессия характерных для различных новообразований мутантных p53, повышая внутриклеточный уровень АФК, приводит к активации сигнального пути HIF1/VEGF-A, что ведет к усиленному опухолевому гемангиогенезу и ускоренному росту опухолей. Антиоксидант NAC подавляет эти эффекты и замедляет опухолевый рост, что указывает на перспективность использования антиоксидантов в комбинации с другими антиангиогенными препаратами в противоопухолевой терапии.

1.5. Роль нарушений p53 в васкулогенной мимикрии

Во многих типах опухолей функционирование кровеносных сосудов может дополняться или заменяться сосудоподобными кровенаполняемыми структурами, которые не выстланы клетками эндотелия – так называемой «васкулогенной мимикрией». Этот феномен известен давно, но до сих пор плохо изучены механизмы формирования сосудоподобных структур. Хотя уже известны молекулярные маркеры васкулогенной мимикрии, остается

неизвестным, что же стимулирует опухолевые клетки к формированию сосудоподобных каналов. Поэтому одной из задач данной работы являлось изучение влияния нарушений p53 на васкулогенную мимикрию. Для этого было проведено иммуногистохимическое окрашивание срезов опухолей, формируемых клетками НСТ116/p53+/+ и НСТ116/p53-/-, антителами к ламинину. Такое окрашивание позволяет выявить как структуры, в состав которых входят ламинины, т.е. васкулогенную мимикрию, так и кровеносные сосуды, базальная мембрана которых формируется этими белками. Площадь васкулогенной мимикрии определяли как разность между относительными площадями ламинин-содержащих структур и CD34-позитивных структур (кровеносных сосудов) после окрашивания серийных срезов опухолевых тканей. Таким образом, мы обнаружили, что в опухолях НСТ116/p53-/- площадь сосудоподобных структур, увеличена в 1,5 раза по сравнению с ксенографтами НСТ116/p53+/+ (Рис. 8А).

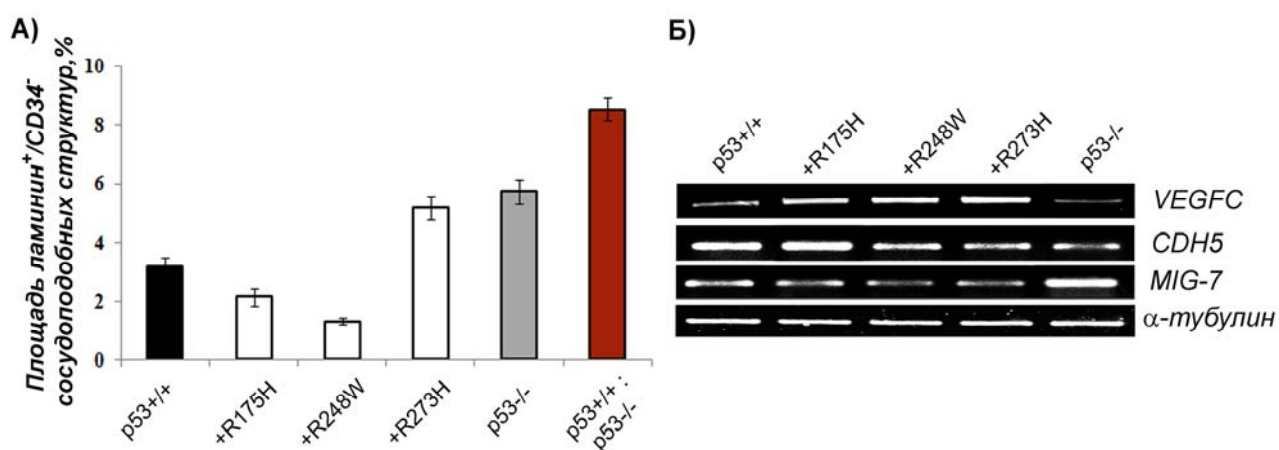


Рис. 8. Влияние статуса p53 в клетках НСТ116 на площадь сосудоподобных структур (А) и экспрессию генов-маркеров васкулогенной мимикрии (Б).

А) Относительная площадь ламинин⁺/CD34⁻ сосудоподобных структур в ксенографтах. Значения представлены как разность между площадью ламинин-позитивных и CD34-позитивных структур. Различия между значениями контрольной группы (p53+/+) и значениями экспериментальных групп достоверны по критерию Стьюдента ($p < 0,05$). Б) ОТ-ПЦР анализ экспрессии генов *VEGFC*, *MIG-7* и *CDH5* в культурах клеток. мРНК *α-тубулина* использовали как контроль количества нанесенных образцов.

Интересно, что к увеличению площади сосудоподобных структур в ксенографтах НСТ116 приводит не только потеря экспрессии p53, но и экзогенная экспрессия мутантного p53 R273H – одной из наиболее частых мутаций p53 в колоректальных раках. При этом экспрессия другого часто встречающегося в этом типе новообразований мутантного p53 – R248W, наоборот, уменьшает площадь сосудоподобных структур, а экспрессия p53

R175H не приводит к статистически значимым изменениям площади сосудоподобных структур. Вероятно, миссенс-мутации p53 могут по-разному влиять на способы васкуляризации опухолевой ткани. Так, мутант p53 R248W, в значительной степени стимулирующий гемангиогенез и, очевидно, за счет этого обеспечивающий кровоснабжение опухолевых тканей, подавляет васкулогенную мимикрию. При этом R273H мутант p53 стимулирует и гемангиогенез и васкулогенную мимикрию, дополняющие друг друга механизмы кровоснабжения опухолей.

Неожиданными оказались результаты эксперимента, когда мышам прививали смесь клеток HCT116/p53+/+ и HCT116/p53-/- в равном соотношении. В этом случае наблюдалось еще большее увеличение площади сосудоподобных структур по отношению к опухолям, образуемым каждой из линий (Рис. 8А). Полученные данные наводят на мысль, что p53 может разнонаправлено регулировать молекулярные детерминанты васкулогенной мимикрии, и что наиболее благоприятным для роста опухолей может являться инактивация p53 не во всех, а только в части опухолевых клеток.

Проведя анализ уровня мРНК генов потенциальных молекулярных маркеров васкулогенной мимикрии, мы не обнаружили жестких корреляций между ее выраженностью и экспрессией *VEGFC*, *MIG-7*, *CDH5* (*VE-кадгерина*) (Рис. 8Б). Таким образом, механизмы обнаруженной нами связи между нарушениями функционирования опухолевого супрессора p53 и стимуляцией васкулогенной мимикрии остаются неясными и требуют дальнейшего изучения. Возможно, наибольшая выраженность васкулогенной мимикрии в опухолях, формируемых смесью p53-позитивных (экспрессирующих *VEGFC* и *CDH5*) и p53-негативных клеток (экспрессирующих *MIG-7*), обусловлена одновременной экспрессией в них большего числа индукторов/маркеров васкулогенной мимикрии, что обеспечивает более эффективное формирование сосудоподобных структур.

1.6. Роль нарушений p53 в опухолевом лимфангиогенезе

Для изучения влияния нарушений p53 на рост лимфатических сосудов было использовано иммуногистохимическое окрашивание срезов подкожных ксенографтов HCT116 антителами к LYVE-1 – надежному маркеру лимфатического эндотелия. Оказалось, что в подкожных ксенографтах HCT116/p53+/+ и HCT116/p53-/- лимфатические сосуды не образуются. Поэтому мы использовали дополнительные модели для изучения опухолевого лимфангиогенеза, в которых выявляются LYVE-1-позитивные структуры. Одна из них – внутрикишечные ксенографты клеток HCT116, привитых в подслизистый слой слепой кишки бестимусных мышей. Вторая

модель – подкожные ксенографты аденокарциномы легкого человека линии А549. Для изучения влияния нарушений опухолевого супрессора p53 на опухолевый лимфангиогенез получена панель стабильных клеточных сублиний производных p53-позитивной линии А549, синтезирующих наиболее характерные для опухолей человека мутантные белки p53 (R175H, R248W, R273H). Кроме того, была получена сублиния А549, в которой экспрессия p53 была подавлена с помощью si-РНК.

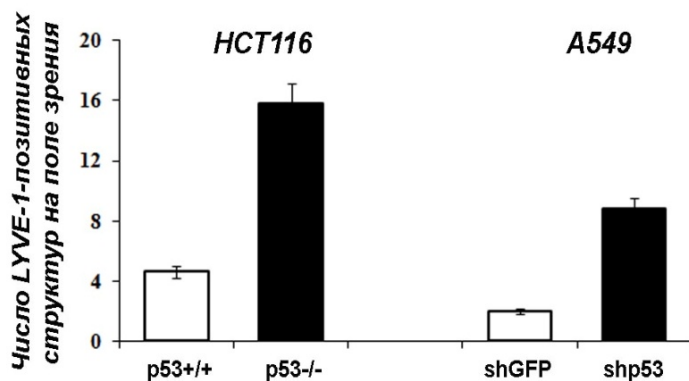


Рис. 9. Количество лимфатических сосудов в ксенографтах НСТ116 и А549 с различной экспрессией p53. Различия достоверны по критерию Стьюдента ($p < 0,01$).

На таких модельных системах методом иммуногистохимического окрашивания антителами к LYVE-1 было показано, что и во внутрикишечных ксенографтах НСТ116, и в подкожных ксенографтах А549, формируемых p53-негативными, клетками количество внутриопухолевых лимфатических сосудов увеличивается примерно в три раза (Рис. 9).

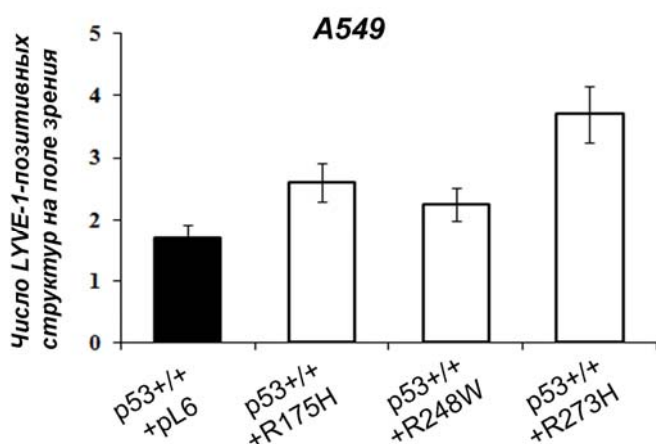


Рис. 10. Влияние миссенс-мутаций p53 на число внутриопухолевых лимфатических сосудов в ксенографтах А549.

Различия достоверны по критерию Стьюдента (между контрольной группой и экспериментальной группой R175H - $p < 0,05$; между контрольной группой и экспериментальной группой R273H - $p < 0,01$).

Наряду с этим мы исследовали влияние миссенс-мутаций p53 в кодонах 175, 248, 273 на опухолевый лимфангиогенез. Было обнаружено, что в ксенографтах А549, синтезирующих R175H, число LYVE-1-позитивных структур увеличено в 1,5 раза, а в ксенографтах, экспрессирующих p53 R273H – наиболее часто встречающийся мутант в раках легкого –

наблюдается двукратное увеличение числа лимфатических сосудов. При этом в опухолях, несущих R248W не наблюдалось статистически значимого изменения количества лимфатических сосудов (Рис. 10).

Таким образом, мы показали, что нарушения функции p53 увеличивают лимфангиогенную активность клеток HCT116 и A549. Проведя анализ экспрессии мРНК генов *VEGFC* и *VEGFD*, кодирующих наиболее мощные из известных в настоящее время индукторы лимфангиогенеза, мы не обнаружили четких корреляций между повышенной лимфангиогенной активностью клеток и экспрессией в них исследуемых генов. Так, экспрессия гена *VEGFD* не изменялась ни в одной из клеточных сублиний HCT116 и A549. Интересно, что повышенная экспрессия гена *VEGFC* обнаруживалась лишь в клетках HCT116 с трансдуцированными мутантными p53, но не при нокауте гена p53 (Рис. 8Б), что указывает на роль вновь приобретенных (gain-of-function), а не доминантно-негативных активностей мутантных белков p53. Однако данный эффект не проявлялся в клетках рака легкого A549, демонстрирующих повышенную лимфангиогенную активность. Таким образом, механизмы впервые обнаруженного нами феномена – стимуляции опухолевого лимфангиогенеза при нарушениях функции p53 в неопластических клетках остаются неясными. Вероятно анализ секрета клеток с различными нарушениями функции p53 и обладающих, вследствие этого, повышенной лимфангиогенной активностью, сможет приблизить нас к пониманию механизмов стимуляции опухолевого лимфангиогенеза.

2. Роль VEGF-C в васкуляризации опухолей

2.1. Влияние подавления продукции VEGF-C на биологические свойства опухолевых клеток в культурах *in vitro*

Обнаружение влияния нокаута гена p53 на уровень экспрессии гена *VEGFC* (Рис. 8Б), побудило нас изучить последствия подавления синтеза его продукта – VEGF-C – основного лимфангиогенного фактора. Для этого на основе вектора pLKO.1-риго были созданы пять лентивирусных конструкций pLKO.1-shVEGFC. Эффективность подавления VEGF-C была проверена в культурах клеток A549 и HCT116 через 3 недели после инфекции. Из пяти полученных конструкций для дальнейших исследований были отобраны конструкции №3 и №5 – наиболее эффективно подавляющие экспрессию VEGF-C. Было обнаружено стабильное подавление продукции как протеолитически незрелой, так и зрелой формы VEGF-C (Рис. 11А). Кроме этого, с помощью иммуногистохимического окрашивания подтверждено подавление синтеза VEGF-C в ксенографтах HCT116 и A549 через 3 и 6 недель соответственно.

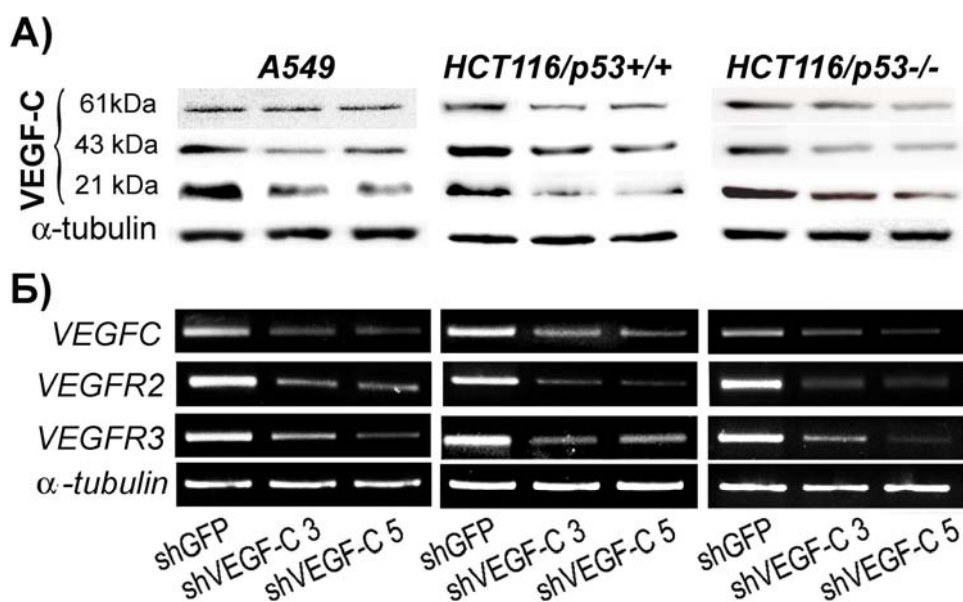


Рис. 11. Влияние трансдукции лентивирусных конструкций pLKO.1-shVEGFC на содержание белка VEGF-C (А) и экспрессию генов *VEGFC*, *VEGFR2* и *VEGFR3* в клетках А549 и НСТ116.

А) Вестерн блот-анализ продукции VEGF-C *in vitro*. Представлены типичные данные одного из трех экспериментов. Б) ОТ-ПЦР анализ экспрессии генов *VEGFC*, *VEGFR2* и *VEGFR3*. Представлены типичные данные одного из трех экспериментов. Белок α -тубулин и мРНК α -тубулина использовали как контроли количества нанесенных образцов.

При этом подавление экспрессии *VEGFC* сопровождалось уменьшением уровня мРНК его рецепторов *VEGFR2* и *VEGFR3* как в p53-положительных, так и в p53-негативных опухолевых клетках (Рис. 11Б).

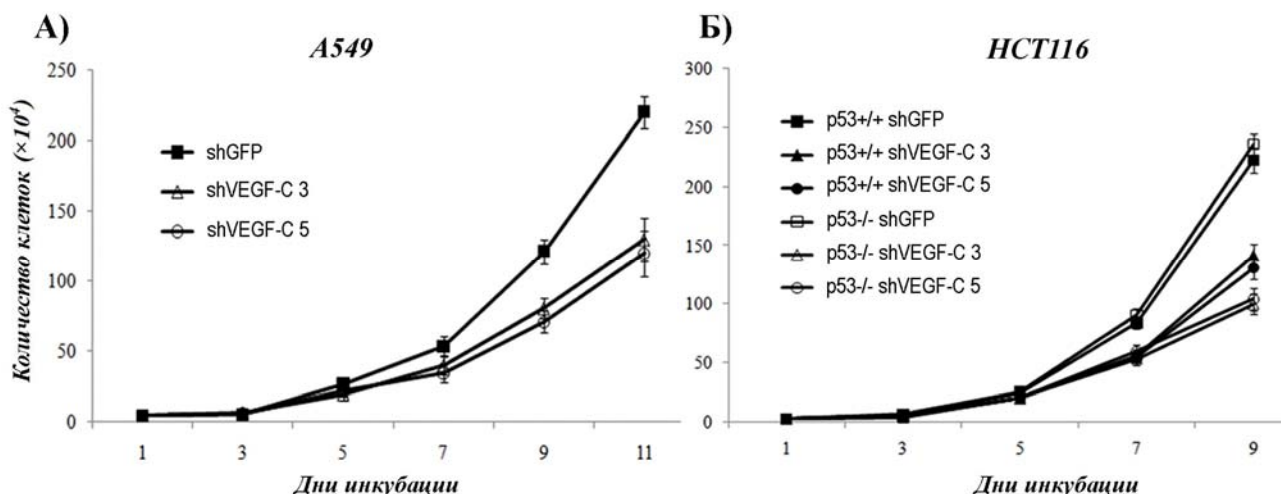


Рис. 12. Влияние подавления продукции VEGF-C на скорость размножения культивируемых *in vitro* клеток А549 и НСТ116.

Представлены типичные данные одного из трех экспериментов. Различия между значениями в экспериментальных и контрольной группах (shGFP) достоверны по критерию Стьюдента ($p < 0,01$).

При изучении последствий ингибирования сигнализаций VEGF-C/VEGFR-2 и VEGF-C/VEGFR-3 на поведение опухолевых клеток в культурах *in vitro* было обнаружено, что снижение продукции VEGF-C тормозит скорость размножения всех исследованных типов клеток (Рис. 12). Ингибирование VEGF-C приводит также к двукратному снижению миграционной активности p53-положительных клеток линий A549 и HCT116 в камере Бойдена. В то же время, p53-негативные клетки HCT116/p53^{-/-}, экспрессирующие *si-VEGFC*, не демонстрировали достоверного подавления миграционной способности (Рис. 13). Возможно, это связано с тем, что p53-негативные клетки характеризуются исходно низкой миграционной активностью, и дополнительное подавление VEGF-C уже не может оказывать существенного влияния на их миграцию.

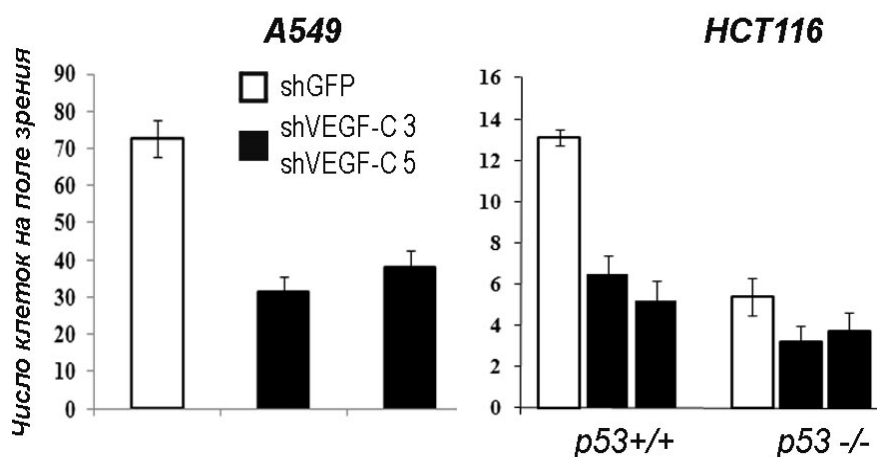


Рис. 13. Влияние подавления продукции VEGF-C на миграцию опухолевых клеток в камере Бойдена.

Представлены типичные данные одного из трех экспериментов. Различия между экспериментальными и контрольными (shGFP) группами p53-положительных клеток достоверны по критерию Стьюдента ($p < 0,01$).

Таким образом, результаты экспериментов *in vitro* указывают на существенную роль VEGF-C в аутокринной регуляции размножения и миграционной активности неопластических клеток.

2.1. Влияние подавления VEGF-C на скорость роста опухолей и ангиогенез

Обнаружено, что снижение продукции VEGF-C приводит к существенному торможению скорости роста опухолевых ксенографтов (Рис. 14). При этом динамика роста ксенографтов рака толстой кишки линии HCT116 существенно ингибировалась вне зависимости от присутствия в опухолевых клетках опухолевого супрессора p53.

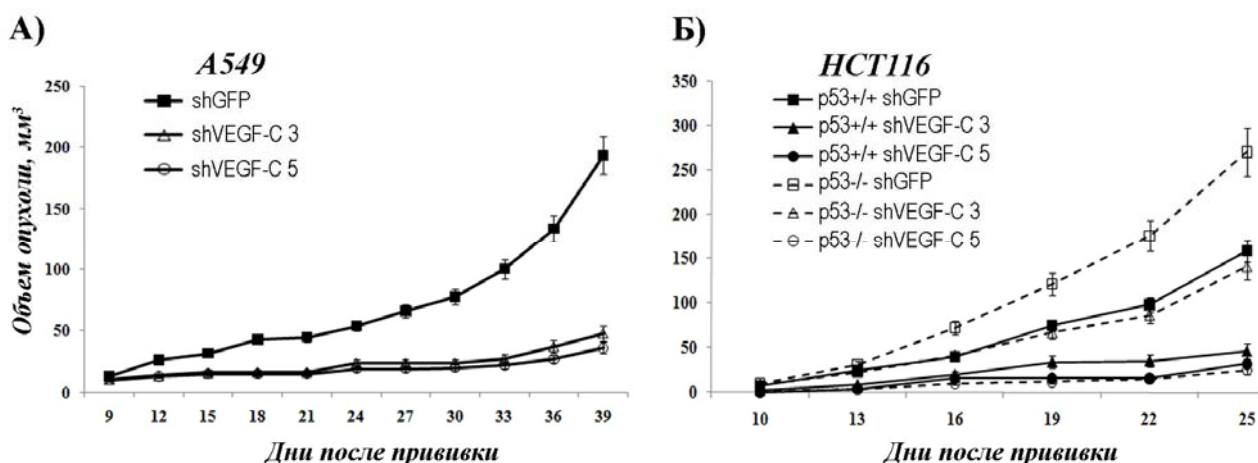


Рис. 14. Влияние подавления продукции VEGF-C на скорость роста подкожных опухолей A549 и HCT116.

Приведены типичные данные одного из трех экспериментов. Различия между значениями в экспериментальных и контрольной группах (shGFP) всех типов опухолей достоверны по критерию Стьюдента ($p < 0,01$).

Замедление роста опухолей могло быть связано как с прерыванием аутокринной стимуляции пролиферации неопластических клеток, так и с ингибированием гемангиогенеза вследствие способности VEGF-C к низкоаффинным взаимодействиям с VEGFR-2. Для проверки этого предположения был проведен иммуногистохимический анализ срезов опухолей, окрашенных антителами к CD34 – маркеру кровеносного эндотелия.

Табл. 3. Влияние подавления продукции VEGF-C на количество CD34-позитивных структур в ксенографтах опухолей.

Ксенографты	Крупные сосуды (>100мкм)	Сосуды с просветами	Сосуды без просветов
A549-shGFP	4,7 ± 0,3	10,7 ± 1,5	8,7 ± 2,1
A549-shVEGFC 3	3,4 ± 0,5	8,6 ± 2,0	10,9 ± 1,9
A549-shVEGFC 5	3,8 ± 0,4	8,7 ± 1,8	14 ± 1,8
HCT116-shGFP	1,6 ± 0,5	8,9 ± 2,0	10 ± 3,2
HCT116-shVEGFC 3	2,3 ± 0,3	9,5 ± 1,5	10,2 ± 2,2
HCT116-shVEGFC 5	2,0 ± 0,4	8,5 ± 1,8	16 ± 2,8
HCT116(p53 -/-)-shGFP	4,2 ± 0,2	15 ± 1,1	10 ± 2,9
HCT116(p53 -/-)-shVEGFC 3	3,0 ± 0,3*	10,4 ± 1,4*	8,5 ± 2,5
HCT116(p53 -/-)-shVEGFC 5	2,2 ± 0,5*	9,1 ± 1,5**	11,2 ± 2,0

Различия между значениями в экспериментальных и контрольной группах (shGFP) ксенографтов HCT116/p53-/- достоверны по критерию Стьюдента: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$.

Оказалось, что подавление синтеза VEGF-C не оказывает достоверного влияния на плотность кровеносных сосудов в опухолях, формируемых p53-позитивными клетками HCT116 и A549, тогда как в p53-негативных опухолях HCT116/p53-/-, в которых уровень VEGF-C исходно ниже, дополнительное ингибирование VEGF-C приводит к уменьшению количества функционирующих сосудов в 1,5-2 раза (Табл. 3).

Таким образом, возможно, что при невысоком уровне продукции VEGF-C подавление его синтеза может тормозить опухолевый рост как за счет ингибирования аутокринной стимуляции пролиферации неопластических клеток, так и за счет уменьшения их гемангиогенной активности.

Основная функция VEGF-C заключается в стимуляции лимфангиогенеза, поэтому было исследовано влияние подавления синтеза VEGF-C на лимфангиогенную активность клеток рака легкого линии A549. С помощью метода иммуногистохимического окрашивания антителами против LYVE-1 и дальнейшего подсчета количества лимфатических сосудов было показано, что подавление продукции VEGF-C приводит к 8-10-кратному ингибированию образования внутриопухолевых лимфатических сосудов в подкожных ксенографтах (Рис. 15).

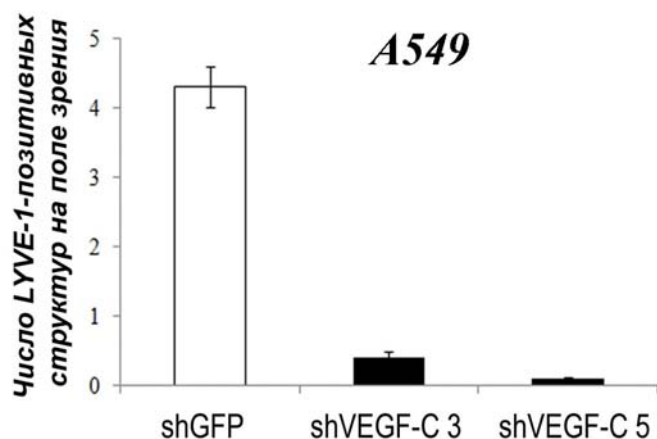


Рис. 15. Влияние подавления продукции VEGF-C на количество лимфатических сосудов в подкожных ксенографтах A549.

Различия достоверны по критерию Стьюдента ($p < 0,005$).

Кроме этого, клетки A549 прививали внутрилегочно бестимусным мышам. Эта модель отвечает всем требованиям для изучения опухолевого лимфангиогенеза: во-первых, сохраняются привычное для клеток A549 микроокружение и физиологические лимфоколлекторы; во-вторых, появляется возможность оценивать количество и внутриопухолевых, и околоопухолевых лимфатических сосудов. Используя такой метод прививки клеток A549, мы обнаружили, что подавление синтеза VEGF-C ингибирует рост первичной опухоли в легком, и в 4 раза подавляет развитие

внутриопухолевых лимфатических сосудов, при этом, достоверного эффекта на плотность околоопухолевых лимфатических сосудов не обнаружено (Рис. 16).

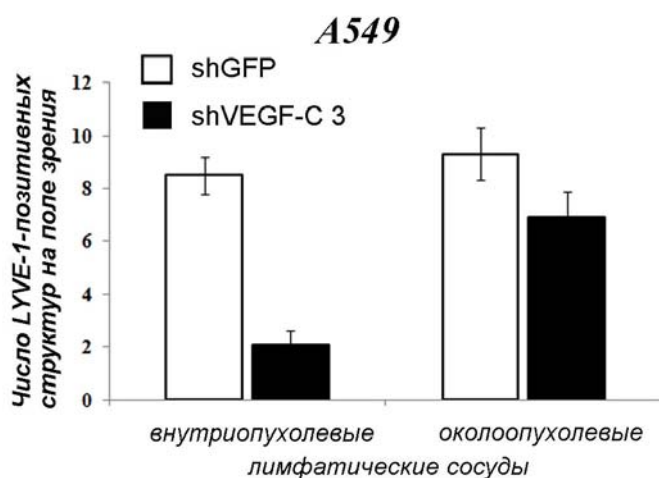


Рис. 16. Влияние подавления продукции VEGF-C на лимфангиогенез во внутрилегочных ксенографтах A549.

Различия по количеству внутриопухолевых лимфатических сосудов достоверны по критерию Стьюдента ($p < 0,01$).

Возможно, такой эффект ингибирования продукции VEGF-C может уменьшить вероятность лимфогенного метастазирования опухолевых клеток и найти применение в клинической практике.

Заключение

В работе изучена роль нарушений функции опухолевого супрессора p53 на различные типы васкуляризации опухолей – гемангиогенез, васкулогенную мимикрию и лимфангиогенез.

Обнаружено стимулирующее действие миссенс-мутаций p53 – наиболее распространенных изменений p53 в различных новообразованиях человека – на рост подкожных ксенографтов клеток рака ободочной кишки человека *in vivo*. Выявлена ключевая роль повышения внутриклеточного уровня активных форм кислорода и активируемого ими сигнального пути HIF1/VEGF-A в индукции опухолевого гемангиогенеза при нарушениях p53. Антиоксидант NAC подавляет эти эффекты и замедляет опухолевый рост, что указывает на перспективность использования антиоксидантов в комбинации с другими антиангиогенными препаратами в противоопухолевой терапии.

Показано влияние дисфункции p53 на выраженность васкулогенной мимикрии в опухолевой ткани. При этом обнаружено, что для наибольшей эффективности такого типа васкуляризации необходима потеря экспрессии p53 не во всех, а только в части опухолевых клеток.

Обнаружено, что нарушения функции p53 в клетках рака ободочной кишки человека приводят к изменению экспрессии гена *VEGFC*. Показано, что подавление продукции цитокина VEGF-C приводит к снижению уровня

экспрессии генов его рецепторов *VEGFR-2* и *VEGFR-3* и вызывает ряд эффектов, ингибирующих опухолевую прогрессию: снижение пролиферативной и миграционной активности клеток *in vitro*, торможение роста подкожных ксенографтов HCT116 и A549, уменьшение способности к формированию сосудоподобных структур и ингибирование лимфангиогенеза. Полученные результаты указывают на то, что VEGF-C может быть перспективной молекулярной мишенью для направленной терапии рака немелкоклеточного легкого и рака ободочной кишки человека.

Выводы

1. Изучено влияние различных нарушений функции опухолевого супрессора p53 в неопластических клетках на гемангиогенез, васкулогенную мимикрию и лимфангиогенез в формируемых ими опухолевых тканях. Обнаружены и описаны неизвестные ранее эффекты различных нарушений p53 на васкуляризацию и прогрессию новообразований.
2. Впервые установлено, что экспрессия характерных для различных новообразований человека мутантных p53 R175H, R248W, R273H, как и потеря экспрессии p53, стимулируют рост ксенографтов рака ободочной кишки HCT116 и увеличивает гемангиогенную активность клеток HCT116, повышая внутриклеточный уровень активных форм кислорода (АФК), активирующих сигнальный путь HIF1/VEGF-A.
3. Снижение внутриклеточного уровня АФК с помощью антиоксиданта НАС ингибирует ангиогенную активность и скорость роста опухолей HCT116 с дисфункцией p53.
4. Впервые выявлено влияние инактивации опухолевого супрессора p53 на васкулогенную мимикрию: гомозиготный нокаут гена p53 и экспрессия мутантного белка p53 R273H стимулируют этот тип васкуляризации опухолевых тканей. При этом для наиболее эффективного формирования васкулогенной мимикрии в опухолях HCT116 необходима инактивация функции p53 не во всех, а только в части неопластических клеток.
5. Впервые продемонстрирована стимуляция опухолевого лимфангиогенеза при подавлении экспрессии p53 в неопластических клетках. При этом не обнаружено прямой корреляции между стимуляцией лимфангиогенеза и повышением экспрессии генов, кодирующих лимфангиогенные цитокины VEGF-C и VEGF-D.
6. Подавление в клетках рака легкого A549 и рака ободочной кишки HCT116 продукции VEGF-C, ген которого является транскрипционной мишенью

p53, снижает экспрессию генов рецепторов *VEGFR-2* и *VEGFR-3*, что приводит к уменьшению васкуляризации опухолей, в частности лимфангиогенеза и васкулогенной мимикрии, замедляет опухолевый рост, а также ингибирует пролиферацию и миграцию опухолевых клеток.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. *Khromova N., Kopnin P., Stepanova E., Agapova L., Kopnin B.* p53 hot-spot mutants increase tumor vascularization via ROS-mediated activation of the HIF-1/VEGF-A pathway.// *Cancer Letters*. – 2009 – 276 (2) – 143-151.
2. *Хромова Н.В., Копнин П.Б., Степанова Е.В., Копнин Б.П.* Влияние подавления синтеза VEGF-C в клетках рака легкого и ободочной кишки человека на их рост, миграционную и ангиогенную активность.// *Российский биотерапевтический журнал*. – 2009 – №3 – с. 21-26.
3. *Копнин Б.П., Копнин П.Б., Хромова Н.В., Агапова Л.С.* Многоликий p53: разнообразие форм, функций, опухоль-супрессирующих и онкогенных активностей.// *Клиническая онкогематология*. – 2008 – 1(1) – с. 2-9.
4. *Агапова Л.С., Черняк Б.В., Дугина В.Б., Хромова Н.В., Копнин Б.П., Копнин П.Б., Скулачев В.П.* и др. SkQ1 подавляет развитие опухолей из p53-дефицитных клеток.// *Биохимия*. – 2008 – т. 73, вып. 12 – с. 1622–1640.

Тезисы докладов

1. *Хромова Н.В., Копнин П.Б., Степанова Е.В., Копнин Б.П.* Ингибирование роста, миграционной и ангиогенной активности опухолевых клеток путем подавления синтеза VEGF-C.// 14 международная школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», 19-23 апреля 2010 г., Пущино, Сборник тезисов, том 1, с. 189.
2. *Замкова М.А., Копнин П.Б., Хромова Н.В., Копнин Б.П.* Изменения активности транскрипционного фактора HSF1 влияют на скорость роста клеток рака ободочной кишки человека *in vitro* и *in vivo*.// 14 международная школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», 19-23 апреля 2010 г., Пущино, Сборник тезисов, том 2, с. 137.