

005001189

Юрлова Екатерина Ивановна

**МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ Т-КАДГЕРИНА НА РОСТ,
МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ И ВАСКУЛЯРИЗАЦИЮ МЕЛАНОМЫ**

03.01.04 - Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

17 НОЯ 2011

Москва
2011

Работа выполнена на кафедре биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор Трещалина Елена Михайловна
кандидат биологических наук, доцент Рубина Ксения Андреевна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор Киселевский Михаил Валентинович
доктор биологических наук, профессор Калинина Елена Валентиновна

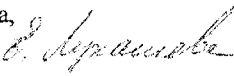
Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Защита диссертации состоится 9 декабря 2011 года в 14.00 на заседании диссертационного совета Д 212.203.13. при Российском университете дружбы народов по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.8, Медицинский факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Российского университета дружбы народов по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Автореферат разослан « » 2011 года

Ученый секретарь Диссертационного Совета,
доктор биологических наук, профессор  Е.В. Лукашева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Т-кадгерин – уникальный представитель суперсемейства кадгеринов. Было обнаружено, что экспрессия Т-кадгерина может исчезать при злокачественной трансформации некоторых клеток. Так, снижение или полное отсутствие экспрессии Т-кадгерина было обнаружено в 80% клеточных линий меланомы человека, в то время как Т-кадгерин экспрессируется в нормальных меланоцитах человека [Kuphal S. et al., 2009, Bosserhoff A.K. et al., 2011].

Т-кадгерин не имеет трансмембранного и цитоплазматического доменов и не участвует в обеспечении прочной межклеточной адгезии в отличие от «классических» кадгеринов, а удерживается на плазматической мембране при помощи гликозилфосфатидилинозитольного (ГФИ) якоря [Ranscht B., Dours-Zimmermann M.T., 1991]. Это свойство, а также локализация в липидных плотках [Doyle D.D. et al., 1998, Philipprova M.P. et al., 1998], в местах сосредоточения многих сигнальных молекул (Src киназ, G белков) [Philipprova M.P. et al., 1998], свидетельствует об участии Т-кадгерина во внутриклеточной сигнализации. Данное предположение также подтверждают данные об участии других ГФИ-заякоренных белков в активации внутриклеточной сигнализации, а именно, в мобилизации кальция и фосфорилировании тирозина, и регуляции таких процессов как пролиферация клеток и продукция лимфокинов [Fisher G.F. et al., 1990, Bohuslav J. et al., 1995, Airas L. et al., 1997].

Т-кадгерин является рецептором с навигационной функцией, регулирующей направление прорастающих нервов и сосудов к своим мишеням [Fredette B.J., Ranscht B., 1994, Ranscht B., Bronner-Fraser M., 1991, Rubina K. et al., 2007]. Было отмечено, что уровень экспрессии Т-кадгерина повышается при ряде заболеваний, связанных с патологическим ростом сосудов [Kudrjashova E. et al., 2002]. Исходя из этих данных, было сделано предположение, что Т-кадгерин может принимать участие в регуляции неоангиогенеза при опухолевом росте. Известно, что опухолевый неоангиогенез является важным фактором опухолевой прогрессии, который обеспечивает интернализацию метастазов и инвазивный путь распространения клеток. Подавление роста сосудов является одним из подходов при лечении онкологических заболеваний [Folkman J., 1971]. Роль Т-кадгерина в регуляции неоангиогенеза на этапе прогрессии опухолевого процесса в настоящее время практически не изучена. Кроме того, данные о роли Т-кадгерина в опухолевом росте и метастазировании противоречивы. Так, на клетках карциномы, глиомы и нейробластомы обнаружено снижение пролиферативной и инвазивной способности опухолевых клеток, трансфицированных кДНК Т-кадгерина [Huang Z.Y. et al., 2003, Lee S.W., 1996, Takeuchi T. et al., 2000]. В то же время повышенный уровень экспрессии Т-кадгерина наблюдается в клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы MAHLAVU [Riou P. et al., 2002, Riou P. et al., 2006], а также астроцитарных опухолях, гетерозиготных по гену нейрофиброматоз 1 или с инактивированным геном нейрофиброматоз 1 [Gutmann D.H. et al., 2001]. Экспрессия Т-кадгерина была обнаружена в эндотелиальных клетках сосудов, прорастающих в ткань различных ксенографтов опухолей человека: рака простаты человека PC-3, тератокарциномы F9 и рабдомиосаркомы A673 [Wyder L. et al., 2000]. На трансгенных мышцах было показано, что инактивация Т-кадгерина приводит к подавлению роста и васкуляризации рака молочной железы [Hebbard L.W. et al., 2008].

На *in vivo* модели подкожной имплантации Матригеля с продуцирующими Т-кадгерин мышинными фибробластами линии L929 было показано, что в микроокружении имплантата создается высокое содержание Т-кадгерина, приводящее к ингибированию начальных этапов ангиогенеза при отсутствии влияния на созревание сосудов. Изучение

механизма этого эффекта *in vivo* и *in vitro* показало, что Т-кадгерин, не влияя на пролиферацию, адгезию и апоптоз эндотелиальных клеток, подавляет их миграцию. Таким образом, сделан вывод о том, что Т-кадгерин является ингибитором ангиогенеза в системах *in vivo* и *in vitro* [Rubina K. et al., 2007].

Указанные феномены возможной взаимосвязи биохимических процессов, обеспечивающих продукцию Т-кадгерина, и патологических процессов, запускающих неоваскуляризацию и прогрессию опухолевого роста, особенно важны для поиска путей ингибирования метастазирующих и наиболее трудно излечимых опухолей, таких как диссеминированная меланома.

Таким образом, выявление роли Т-кадгерина в запуске механизмов прогрессии опухолей, в частности, меланомы, сопряжённых с регуляцией неангио- и васкулогенеза, является актуальным и позволит не только дополнить данные о значении опухолевого микроокружения, но и определить критические точки для подавления кровоснабжения на этапе опухолевой прогрессии. Исследование указанных механизмов является актуальной задачей также в плане поиска новых мишеней для “таргетного” противоопухолевого лечения.

Цель работы: выявить механизмы влияния Т-кадгерина на рост, метастазирование и васкуляризацию на примере метастазирующей мышинной меланомы *in vitro/in vivo*.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние экспрессии Т-кадгерина на пролиферацию клеток мышинной меланомы *in vitro* и рост первичного узла *in vivo*;
2. Определить влияние Т-кадгерина на экспрессию факторов неангиогенеза в клетках меланомы *in vitro* и на васкуляризацию первичного узла *in vivo*;
3. Оценить влияние экспрессии Т-кадгерина в клетках меланомы на пролиферацию и миграцию стромальных клеток в опухоль *in vivo* и при сокультивировании *in vitro*;
4. Сравнить клетки мышинной меланомы с разным уровнем экспрессии Т-кадгерина по их способности к метастазированию и инвазии.

Положения, выносимые на защиту:

1. Экспрессия Т-кадгерина в клетках мышинной метастазирующей меланомы B16F10 сопряжена с ускорением пролиферации *in vitro* и роста первичного узла *in vivo* под кожей у гибридных мышей BDF1. В клетках мышинной меланомы, гиперэкспрессирующих Т-кадгерин, значимо (в 6 раз) возрастает экспрессия c-Met, рецептора фактора роста гепатоцитов (hepatocyte growth factor, HGF).
2. Клетки меланомы B16F10, экспрессирующие Т-кадгерин, формируют *in vivo* под кожей у гибридных мышей BDF1 опухолевые узлы, отличающиеся подавленной неоваскуляризацией. Экспрессия Т-кадгерина в клетках меланомы B16F10 *in vitro* сопряжена с усиленной экспрессией ингибиторов и сниженной экспрессией стимуляторов неангиогенеза.
3. При экспрессии Т-кадгерина клетки меланомы B16F10 индуцируют усиление миграции стромальных клеток *in vitro*, а *in vivo* активируют привлечение их в первичный узел за счёт увеличения экспрессии хемокинов, выполняющих роль хемоаттрактантов для мезенхимальных стромальных клеток.
4. Инвазивный потенциал *in vitro* и метастатический потенциал *in vivo* экспрессирующих Т-кадгерин клеток меланомы B16F10 возрастает за счёт усиления экспрессии MMP14 и ряда проонкогенных интегринов.

Научная новизна.

Впервые показано подавление неопластического ангиогенеза *in vivo* в ткани экспрессирующей Т-кадгерин мышинной метастазирующей меланомы B16F10, сопряжённое с увеличением экспрессии специфических ингибиторов (CXCL 10, angiopoietin 2, procollagen type XVIII alpha 1, chromogranin A) и снижением экспрессии стимуляторов (TG α и Tie-1) ангиогенеза.

Впервые установлено, что подавление неоваскуляризации меланомы B16F10, перевитой подкожно мышам-гибридам BDF1, проявляется в уменьшении количества прорастающих в первичный опухолевый узел сосудов среднего диаметра и капилляров.

Впервые обнаружен феномен привлечения мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в первичный узел меланомы B16F10, клетки которого экспрессируют Т-кадгерин, и впервые в качестве гипотезы механизма этого феномена предложено увеличение продукции хемокинов под действием Т-кадгерина.

Впервые в рамках последовательного изучения функциональных особенностей клеток *in vitro* и *in vivo* получены данные о достоверном усилении агрессивности экспрессирующих Т-кадгерин клеток мышинной метастазирующей меланомы B16F10.

Впервые *in vitro* и *in vivo* на примере высоко метастазирующего клона F10 мышинной меланомы B16 составлено интегральное представление о роли белка Т-кадгерина в регуляции пролиферации, инвазии и метастазирования злокачественной опухоли, т.е. в её прогрессии.

Научно-практическая значимость. В результате исследования механизма влияния Т-кадгерина на рост, метастазирование и васкуляризацию меланомы выявлены важные факторы, принимающие участие в регуляции злокачественного процесса. Эти факторы дополняют существующую систему знаний в области биохимии регуляторных белков, а также экспериментальной биологии меланомы - одной из наиболее сложных по биологическим характеристикам опухолей. Доказательство стимуляции различных проявлений прогрессии экспрессирующей Т-кадгерин метастазирующей меланомы, сопряжённое с выключением неоваскуляризации, позволяет рассматривать этот рецептор как возможную практическую мишень для противоопухолевой терапии.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы представлены на:

- 1) 3-х международных конференциях (35-ом Международном конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (FEBS) (Гётеборг, Швеция, 26 июня - 1 июля 2010); ежегодной конференции Международного Общества геной и клеточной терапии рака (ISCGT) (Корк, Ирландия, 2-4 сентября 2009); 3-ей Международной конференции по ангиогенезу (Амстердам, Нидерланды, 1-3 марта 2007));
- 2) Совместном заседании кафедры биохимии и молекулярной медицины, научно-исследовательской лаборатории генных и клеточных технологий факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей и лаборатории комбинированной терапии опухолей НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН 29.09.2011 г.;
- 3) Научной конференции лаборатории комбинированной терапии опухолей НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН 19.10.2011 г.;
- 4) Заседании кафедры биохимии медицинского факультета РУДН 21.10.2011 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 1 статья в рецензируемом журнале, 1 глава в сборнике статей и 10 тезисов докладов.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 147 страницах машинописного текста, содержит 38 рисунков, 5 таблиц. Состоит из глав: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение результатов, Список литературы. Список литературы содержит 287 источников, из них 3 отечественных, 284 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Клеточные культуры. В работе использовали клеточную линию мышиной метастазирующей в лёгкие меланомы B16, клон F10 (ATCC® №CRL-6475™), эмбриональные фибробласты мыши NIH/3T3 (ATCC® №CRL-1658™) и мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани мыши (МСК-ЖТ). Культивирование клеточных линий B16F10 и NIH/3T3 *in vitro* проводили в полной среде RPMI1640 (HyClone, США), а МСК-ЖТ после выделения культивировали в полной среде DMEM (HyClone, США) в соответствии со стандартными условиями.

Получение клонов и суммарной популяции клеток меланомы B16F10 с экспрессией Т-кадгерина. Клетки B16F10 стабильно трансфицировали полноразмерной кДНК Т-кадгерина человека, клонированной в плазмиду для эукариотической экспрессии pcDNA™3.1 (Invitrogen, США) с устойчивостью к G418 (Geneticin®) [Rubina K. et al., 2005] с использованием трансфицирующего реагента Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Путём отбора в среде, содержащей селективный антибиотик G418 (Invitrogen, США) в концентрации 2 мг/мл, получали суммарную популяцию клеток мышиной меланомы B16F10, экспрессирующих Т-кадгерин. Клоны с разной экспрессией Т-кадгерина получали путём клонирования суммарной популяции на селективной антибиотике. Для контрольных экспериментов клетки меланомы B16F10 трансфицировали контрольной плазмидой pcDNA™3.1/CAT (Invitrogen, США) с устойчивостью к G418 и путём отбора в среде, содержащей селективный антибиотик G418 в концентрации 2 мг/мл, получали суммарную популяцию контрольных клеток. Контрольный клон клеток получали путём клонирования контрольной суммарной популяции на селективной антибиотике. Уровень экспрессии Т-кадгерина в суммарных популяциях и клонах клеток мышиной меланомы B16F10 подтверждали методом иммуноблоттинга.

Получение клеток МСК-ЖТ из мышей. МСК-ЖТ мыши были выделены из подкожного жира области бёдер самцов линии CBA/C57BL. После измельчения жировую ткань обрабатывали коллагеназой I типа (200 ед/мл, Worthington, США) и протеазой (30 ед/мл, Worthington, США) в среде DMEM в течение часа при температуре 37° С. Затем к суспензии добавляли равный объём полной среды DMEM и центрифугировали (10 минут, 200g). Осадок, в котором находилась фракция стромально-васкулярных клеток, ресуспендировали в полной среде DMEM, фильтровали через фильтр с диаметром пор 40 мкм и центрифугировали (5 минут, 200g). Для лизиса эритроцитов к осадку добавляли 9 мл стерильной дистиллированной воды и инкубировали 2 минуты. Затем добавляли 1 мл стерильного 10-кратного PBS (Sigma-Aldrich, США) и центрифугировали (5 минут, 200g). Полученный осадок ресуспендировали в полной среде роста DMEM и высаживали в концентрации 10⁴/мл. Для экспериментов использовали клетки второго пассажа.

Иммуноблоттинг. Экспрессию Т-кадгерина методом иммуноблоттинга определяли в клеточных лизатах (суммарные популяции B16F10, клоны B16F10, NIH/3T3, МСК-ЖТ) и в среде культивирования клонов B16F10. Для получения лизатов к клеткам (3T3,

МСК-ЖТ, B16F10) добавляли холодный лизис – буфер: 50 mM Tris– HCl (Sigma-Aldrich, США), pH 8, 5mM EDTA (AppliChem, Германия), 1% Triton X-100 (PRS Panreac, Испания), 150 mM NaCl (PRS Panreac, Испания), Protease Inhibitor Cocktail (1:100) (Sigma-Aldrich, США). Клетки лизировали 15 минут при +4°C. Далее полученный лизат центрифугировали (30 минут, 13,200 об/мин) при +4 °C. Концентрацию тотального белка в лизатах клеток определяли на фотометре Multiscan Ascent (LabSystems, США) по методу Брэдфорд (Bradford) при длине волны 595 нм (Bradford, 1976). Для получения концентрированных кондиционированных клетками клонов B16F10 сред клетки контрольного клона и экспрессирующих Т-кадгерин клонов инкубировали 48 часов в 7 мл полной среды RPMI1640. После этого 4 мл ростовой среды от каждого клона наносили на колонку Centricon 30 кДа (Millipore, США) и центрифугировали (20 минут, 4000 об/мин) при комнатной температуре. В полученный концентрат добавляли Protease Inhibitor Cocktail (1:100), замораживали и хранили на –20°C. Электрофорез белков проводили в присутствии 20% SDS (Sigma-Aldrich, США). Анализируемые образцы смешивали с буфером для нанесения (Laemmli buffer), содержащим 4% β-меркаптоэтанола (Helicon, Россия), и инкубировали 5 минут при 99°C. После этого образцы наносили на SDS/полиакриламидный гель (7,5%) из расчета 30 мкг белка на лунку. Для определения молекулярных масс белков использовали стандартную коммерческую смесь предокрашенных белков BenchMark™ (Invitrogen, США). После электрофореза перенос белков из геля на Amersham Hybond-P PVDF мембрану (GE Healthcare, Великобритания), предварительно смоченную буфером для электропереноса, осуществляли методом полусухого электроблоттинга. После переноса мембрану промывали в TBS/Tween (150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7,6, 0,05% Tween 20 (PRS Panreac, Испания)), а затем инкубировали в TBS/Tween, содержащем 5% обезжиренное молоко. В качестве первичных антител использовали антитела кролика против Т-кадгерина (1:1000, Biodesign International, США), вторичных: антитела козла против антител кролика, конъюгированных с пероксидазой хрена (1:10000, Immune Jackson Research, США). Для контроля эквивалентности нанесения белка на гель проводили иммуноблоттинг с антителами к изоформам актина (Sigma-Aldrich, США). Для визуализации белка, связавшегося с антителами, использовали двухкомпонентную ECL™ Western Blotting систему (GE Healthcare, Великобритания) и экспонировали мембраны с использованием пленки X-ray Retina XBM (Fotochemische Werke, Германия). Денситометрический анализ полученных полос проводили с помощью прибора GS-800 Calibrated Densitometer (Bio Rad, США) и программного обеспечения Quantity One® 4.6 (Bio Rad, США).

Оценка пролиферации клеток клонов B16F10 *in vitro*. Перед проведением экспериментов клетки B16F10 депривировали в среде RPMI1640, содержащей 0,1% FBS, в течение 24 часов. Оценку пролиферации клонов мышинной меланомы B16F10 осуществляли двумя методами: подсчетом абсолютного числа клеток с помощью прибора CellCounter (Invitrogen, США) и измерением клеточного индекса с помощью системы xCELLigence (Roche, США). В первом случае, клоны B16F10 сажали на 6-луночный планшет в количестве 1×10^5 на лунку в полной ростовой среде RPMI 1640. Каждые 24 часа (в течение 72 часов) клетки снимали с одной лунки 6-луночного планшета с помощью 0,25% раствора трипсина (HyClone, США) и производили подсчет абсолютного числа клеток на приборе CellCounter (n=5). Во втором случае, клоны B16F10 сажали на планшеты E-plate (Roche, США). Перед посадкой клеток планшет со 100 мкл полной среды RPMI1640 в каждой лунке помещали на 30 минут в CO₂-инкубатор, после чего его переносили в RTCA SP Station (Roche, США) и снимали

показатели фона для каждой лунки с помощью RTCA Analyzer (Roche, США). Клетки для эксперимента снимали с чашек с помощью HyQase (HyClone, США) и считали с помощью прибора CellCounter. В каждую лунку сажали клетки в концентрации 5×10^3 в 100 мкл полной среды RPMI1640. После чего планшет с клетками помещали в RTCA Station и анализировали динамику роста клонов мышиной меланомы в режиме реального времени (первые 5 часов измерения проводились с интервалом 1 минута, последующие 96 часов – с интервалом 10 минут) ($n=3$). Анализ полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения RTCA Software 1.2.1 (Roche, США).

Оценка распределения клеток клонов B16F10 по фазам клеточного цикла *in vitro*. Для синхронизации клеточного цикла клетки клонов B16F10 депривировали в среде RPMI1640, содержащей 0,1% FBS, в течение 24 часов. Затем клетки стимулировали полной средой RPMI1640 в течение 48 часов, после чего их снимали с чашек 0,25 % раствором трипсина. Затем суспензию клеток фиксировали ледяным 70%-ным этанолом (2 часа, -20°C) и окрашивали в течение 30 минут при комнатной температуре раствором йодистого пропидия (PI) (на PBS, 50 мкг/мл) (Invitrogen, США), содержащем 200 мкг/мл РНКазы А (Invitrogen, США) и 0,1% Тритона X100. Содержание ДНК в клетках клонов B16F10 определяли по флуоресценции PI в диапазоне длин волн 600-625 нм (при возбуждении длиной волны 488 нм) методом проточной цитометрии с помощью клеточного сортера MoFlo (DakoCytomation, Дания) ($n=3$). Данные проточной цитометрии анализировали с помощью программы для математического анализа распределения клеток по стадиям клеточного цикла ModFit LT 3.2 (Verity Software House, США).

Оценка количества клеток клонов B16F10 на разных стадиях некроза и апоптоза *in vitro*. Клетки клонов мышиной меланомы снимали с чашек при помощи 0,25% трипсина, отмывали в буфере для связывания Аннексина V (BD Biosciences, США) и ресуспендировали в 200 мкл этого же буфера. После этого к клеткам добавляли 5 мкл AnV-PE (Аннексин V – фикоэритрин, BD Biosciences, США) и 10 мкл 7-AAD (BD Biosciences, США) и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте. С помощью проточной цитометрии на приборе FACSCanto II™ (BD Biosciences, США) определяли количество аннексин V и 7-AAD – позитивных клеток; аннексин V – позитивных - 7-AAD – негативных клеток; аннексин V и 7-AAD – негативных клеток.

Анализ экспрессии генов в клетках клонов B16F10 *in vitro*. Выделение РНК из клонов клеток мышиной меланомы осуществляли с помощью RNeasy Mini kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу фирмы-производителя с добавлением стадии обработки ДНКазой I (Qiagen, Германия) в течение 30 минут при комнатной температуре. Концентрацию и качество выделенной тотальной РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США) с использованием программного обеспечения ND-1000 V 3.7.1 (Thermo Scientific, США). Для последующей процедуры обратной транскрипции отбирали образцы РНК со следующими показателями: $260\text{nm}/280\text{nm} = 2,260\text{nm}/230\text{nm} = 1,8-2,2$. Для синтеза кДНК 1 мкг РНК смешивали с 0,5 мкг Oligo (dT)₁₈ primer (0,5 мкг/мкл, Fermentas, США) и инкубировали 5 минут при 65°C . После инкубации к смеси добавляли 4 мкл 5x reaction buffer (Fermentas, США), 0,5 мкл RiboLock™ RNase Inhibitor (40 у/μl, Fermentas, США), 2 мкл 10 mM смеси нуклеотидов dNTP mix (Fermentas, США) и инкубировали 5 минут при 37°C . После инкубации в смесь добавляли 2 мкл M-Mul V Reverse Transcriptase (20 у/μl, Fermentas, США) и инкубировали 60 минут при 37°C . Реакцию останавливали нагреванием смеси до 70°C в течение 10 минут. На клетках клонов мышиной меланомы методом ПЦР в реальном

времени был произведён анализ уровня экспрессии следующих генов (n=5): VEGF A, PDGF B, HGF, EGF, bFGF, uPAR, uPa, c-Met (HGFR), MMP2, MMP9. Гены GAPDH и β -актин использовали для сравнительной оценки уровня экспрессии исследуемых генов.

Специфические пары праймеры для анализа исследуемых генов были изготовлены фирмой Синтол (Россия), имели следующую последовательность (5'-3') и температуру отжига: *GAPDH mouse* (60°) прямой GACCCCTTCATTGACCTCAACTAC, обратный TGGTGGTGCAGGATGCTGCTGA; *актин β mouse* (61°) прямой AGTGTGACGTTGACATCCGTA, обратный GCCAGAGCAGTAATCTCTCTCT; *VEGF A mouse* (60°) прямой AGAGCAGAAGTCCCATGAAGTGA, обратный TCAATCGGACGGCAGTAGCT; *PDGF B mouse* (58,5°) прямой TCTCTGCTGCTACCTGCGTCTGG, обратный GTGTGCTCGGGTCATGTTCAAGTC; *HGF mouse* (60°) прямой TCATTGGTAAAGGAGGCAGCTATA, обратный CTGGCATTTGATGCCACTCTTA; *EGF mouse* (60°) прямой CCTGCCCCCTTCTCTAGTTTTC, обратный CTCGGTCTGTGGTCTACCC; *bFGF mouse* (58,5°) прямой CGGCATCACTCGCTTCC, обратный TGCCAGTTCGTTTCACTGC; *uPaR mouse* (60°) прямой CGTTACCTCGAGTGTGCGTCTCTG, обратный AGCCTCGGGTGTAAGTCTCTCTCT; *uPa mouse* (53°) прямой GAATGCGCCTGCTGTCC, обратный AGGGTCGCTTCTGGTTGTC; *c-Met mouse* (60°) прямой CAACGAGAGCTGTACCTTGACCTTA, обратный GCGGGACCAACTGTGCAT; *MMP 2 mouse* (53°) прямой AGTTCCCCGTCCGCTTCC, обратный GACACATGGGGCACCTTCTG; *MMP9 mouse* (61°) прямой CTGGACAGCCAGACACTAAAG, обратный CTCGCGGCAAGTCTTCAGAG. Для каждого исследуемого гена приготавливали смесь праймеров (прямого и обратного) в конечной концентрации 5 пкмоль/мкл каждого праймера. Для приготовления одной пробы использовали 10 мкл реакционной смеси, содержащей SYBR Green I (Синтол, Россия), 13 мкл ddH₂O (Синтол, Россия), 1 мкл смеси праймеров и 1 мкл кДНК. Для приготовления отрицательного контроля без добавления матрицы (non-template control, NTC) проб вместо кДНК добавляли 1 мкл ddH₂O. ПЦР в реальном времени проводили на приборе Rotor – Gene™ 3000 (Corbett Research, Великобритания). Анализ кривых амплификации производили с помощью программы Rotor – Gene Analysis Software 6.0 (Corbett Research, Великобритания). Для всех проб использовали 40 циклов амплификации. После проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени полученные данные по значениям порогового цикла для каждого гена обрабатывали согласно формуле: $N=2^{-\Delta C} \cdot 1000$, $\Delta C = C_1 - C_{hk}$, где C_1 - значение порогового цикла для исследуемого гена, C_{hk} - среднее значение порогового цикла для двух генов “домашнего хозяйства”, N - результат в относительных единицах.

На матрице РНК с использованием RT² First Strand Kit (SABiosciences™, США) синтезировали кДНК согласно протоколу фирмы-производителя. Для реакции обратной транскрипции брали 1 мкг РНК. Для проведения реакции ПЦР использовали наборы реагентов RT² Real-Time™ SYBR Green/Fluorescein PCR master mix (SABiosciences™, США). Для анализа влияния Т-кадгерина на изменение профиля экспрессии в клетках клонов B16F10 были использованы следующие системы анализа экспрессии генов мыши RT² Profiler PCR Array (SABiosciences™, США), адаптированные для проведения ПЦР на приборе IQ5 (BioRad, США): внеклеточный матрикс и молекулы адгезии, ангиогенные факторы и ингибиторы ангиогенеза, хемокины и их рецепторы. Для нормализации результатов исследования использовали 5 генов “домашнего хозяйства”: B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH, ACTB, входящие в состав набора.

Оценка инвазивного потенциала клеток клонов B16F10 *in vitro*. За 24 часа до эксперимента клетки клонов мышиной меланомы депривировали в среде RPMI1640, содержащей 0,1% FBS. После чего клетки в концентрации 3×10^5 /мл смешивали с 5 мкл GFR Matrigel™ (Growth Factor Reduced Matrigel, BD Biosciences, США) в соотношении 1:1. После чего из 0,2 мкл полученной смеси формировали капли. После полимеризации капли GFR Матригеля с клетками сверху наносили 5 мкл Matrigel™ (BD Biosciences, США), содержащего факторы роста. После полимеризации чашки заливали полной средой RPMI1640 (Рисунок 1).

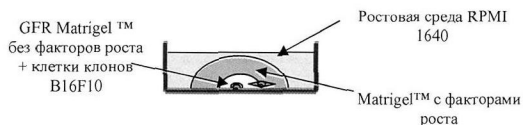


Рисунок 1. Схема формирования капель Матригеля для оценки инвазивного потенциала клеток клонов мышиной меланомы B16F10 *in vitro*.

Полученные капли фотографировали через 48 часов с помощью микроскопа Leica AF6000 (Leica Microsystems, Германия). В программе Las (Leica Application Suite) AF (Leica Microsystems, Германия) измеряли диаметры капли (D1 и D2) и подсчитывали число клеток, инвазивировавших из GFR Матригеля в полный Матригель.

Влияние среды роста от клеток клонов B16F10 на миграцию и пролиферацию МСК-ЖТ *in vitro*. Для оценки пролиферации МСК-ЖТ сажали в концентрации 10^4 /мл на 24-луночный планшет в 500 мкл среды RPMI1640, содержащей 0,1% FBS. В этот же день в верхнюю камеру вставки Transwell® (Millipore, США) сажали клетки клонов B16F10 в концентрации 5×10^3 /мл в 200 мкл полной среды RPMI1640. В качестве контроля в верхнюю камеру сажали клетки NIH/3T3 в той же концентрации, что и клоны меланомы, а также в качестве контроля в верхнюю камеру вносили 200 мкл полной среды RPMI1640. В эксперименте использовали вставку с мембраной, диаметр пор в которой составлял 0,4 мкм. На следующий день заменяли среду во вставках с посаженными на них клетками меланомы и NIH/3T3 на RPMI1640, содержащую 0,1% FBS, и помещали в 24-луночный планшет с посаженными клетками МСК-ЖТ (Рисунок 2А). После инкубации в течение 48 часов клетки МСК-ЖТ в нижней камере промывали PBS, фиксировали 4% формальдегидом (PRS Panreac, Испания) и окрашивали гематоксилином Майера (Dako, США). На окрашенных препаратах осуществляли подсчёт количества клеток, что отражает влияние ростовой среды от клеток клонов мышиной меланомы на пролиферацию клеток МСК-ЖТ.

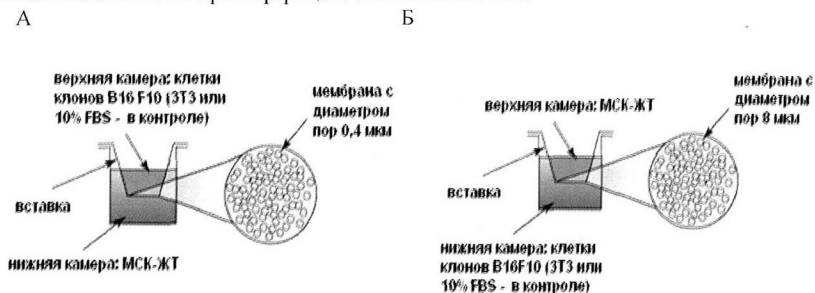


Рисунок 2. Схема эксперимента по изучению влияния среды роста от клеток клонов меланомы B16F10 на пролиферацию (А) и миграцию (Б) МСК-ЖТ.

Для оценки влияния среды роста от клонов мышиной меланомы на миграцию МСК-ЖТ использовали вставку Transwell® с мембраной, диаметр пор в которой составлял 8 мкм. Мембрану вставки перед экспериментом покрывали коллагеном I (0,1 мкг/мл) (Имтек, Россия). Клетки МСК-ЖТ сажали в концентрации 5×10^4 /мл в верхнюю камеру вставки в 200 мкл среды RPMI1640, содержащей 0,1% FBS. В этот же день в лунки 24-луночного планшета сажали клетки клонов мышиной меланомы B16F10 в концентрации 10^5 /мл в 500 мкл полной среды RPMI1640. В качестве контроля в нижнюю камеру сажали клетки NIH/3T3 в той же концентрации, что и клоны меланомы, а также в качестве контроля использовали полную среду RPMI1640. На следующий день заменяли среду в нижних камерах с посаженными на них клетками B16F10 и NIH/3T3 на RPMI1640, содержащую 0,1% FBS, и помещали вставки с посаженными клетками МСК-ЖТ в 24-луночный планшет (Рисунок 2Б). После инкубации в течение 48 часов клетки МСК-ЖТ на нижней стороне мембраны вставки промывали PBS, фиксировали 4% формальдегидом и окрашивали гематоксилином Майера. На окрашенных мембранах осуществляли подсчёт количества клеток, что отражает влияние ростовой среды от клонок клонов мышиной меланомы на миграцию клеток МСК-ЖТ.

***In vivo* модель гематогенно метастазирующей в лёгкие меланомы у мышей.** Мышам (BDF1, n=11) подкожно вводили суспензию клеток клонов высокометастазирующей в лёгкие меланомы B16F10 (1×10^6 клеток в 0,3 мл среды RPMI1640). В течение 28 дней анализировали кинетику опухолевого роста по размерам опухолей (7 измерений). На 29 сутки у мышей извлекали легкие, определяли частоту метастазирования (отношение числа мышей с метастазами к общему числу анализируемых мышей) и легочный коэффициент (отношение средней массы лёгких в опытной группе к средней массе лёгких здоровых мышей). Части первичных узлов погружали в среду Tissue-Tek (Sakura, США), замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -20°C. Образцы первичных узлов мышей использовали для приготовления срезов толщиной 7 мкм. Перед окрашиванием срезы фиксировали в 4% формальдегиде 10 минут при комнатной температуре, промывали PBS и инкубировали 10 минут в 0,2 % растворе Тритона X100. После инкубации срезы промывали в PBS и наносили нормальную сыворотку крови донора вторых антител (осла) (1:10, Sigma-Aldrich, США), после чего препараты отмывали в PBS. Для двойной окраски срезы последовательно инкубировали в первых антителах: сначала на срезы наносили моноклональные антитела крысы против маркера эндотелиальных клеток CD31 мыши (1:100, BD Biosciences, США) или против маркера CD90 мыши (1:100, BD Biosciences, США) на 60 минут, а затем антитела кролика против Т-кадгерина (1:100, Biodesign International, США). В качестве негативного контроля на срезы наносили фракции иммуноглобулинов неиммунной сыворотки крысы и кролика. После отмывки в PBS, срезы помещали в смесь вторых антител осла: против антител крысы, конъюгированных с флуорохромом Alexa488 (Molecular Probes®, Invitrogen, США), и против антител кролика, конъюгированных с флуорохромом Alexa594 (Molecular Probes®, Invitrogen, США) на 60 минут. Ядра клеток докрашивали флуоресцентным красителем DAPI (Sigma-Aldrich, США). После отмывки в PBS срезы заключали в среду Mounting Medium Vectashield™ (Vector Laboratories, США). Полученные препараты анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа Leica AF6000. Документирование изображений производили с помощью цифровой видеокамеры Axioscam и обработки в программе Las AF. На срезах, окрашенных антителами против CD31 и Т-кадгерина, производили подсчет сосудов в 4-5 полях зрения (сосуды среднего диаметра - CD31-положительные образования длиной от 20 до 40 мкм, крупные сосуды - диаметром более 40 мкм и капилляры - диаметром менее 20

мкм, без просвета), количество сосудов в поле зрения соотносили с площадью поля зрения по DAPI. Вклад стромального компонента в прогрессию первичного узла мышинной меланомы оценивали путём подсчёта отношения площади CD90-позитивных областей к общей площади среза в программе MetaMorph5.0 (Universal Imaging, США). Для анализа количества очагов некроза срезы после фиксации окрашивали гематоксилином Майера и подсчитывали отношение количества срезов с очагами некроза к общему количеству срезов.

In vivo модель хориоаллантоисной мембраны куриного эмбриона. Для изучения ангиогенеза *in vivo* была использована модель - хориоаллантоисная мембрана куриного эмбриона по методике, описанной в Angiogenesis Protocols V.46 (West et al., 2003). Оплодотворённые яйца инкубировали при +37° С и 70% влажности. Суммарную популяцию гиперэкспрессирующих Т-кадгерин или контрольных клеток мышинной меланомы B16F10 имплантировали в хориоаллантоисную мембрану куриного эмбриона на 30-31 стадии развития (по Hamburger и Hamilton, 1951) в виде суспензии в полной среде RPMI 1640 в концентрации 1 млн. клеток в 500 мкл среды. Хориоаллантоисную мембрану контрольных и экспериментальных эмбрионов анализировали через 3 дня после операции и фотографировали с использованием стереомикроскопа (Olympus SZX 16, камера AxioCam HRC, Zeiss) и программы Axio Vision 3.1.

Завершение экспериментов с животными. Мышей умерщвляли передозировкой эфирного наркоза, трупы подвергали замораживанию и кремировали в специализированном подразделении РОНЦ с учетом международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных, изложенных в "Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей", ЕЭС, Страсбург, 1985 г. [Ланималогия, 1993], а также требований Хельсинкской декларации и Всемирной медицинской ассоциации (2000) [Большаков О.П. с соавт., 2002].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 6,0 (StatSoft, США), применяя непараметрический критерий Манна-Уитни. Данные выражали в виде $M \pm m$, где M - среднее арифметическое, а m - стандартная ошибка среднего.

Результаты исследований и их обсуждение

Анализ экспрессии Т-кадгерина. В результате стабильной трансфекции контрольной плазмидой или плазмидой, содержащей кДНК Т-кадгерина, и последующей селекции на среде, содержащей селективный антибиотик G418, было получено 2 популяции клеток мышинной меланомы B16F10: суммарная популяция, клетки которой гиперэкспрессируют Т-кадгерин (B16F10 Т (+) сумм), и контрольная суммарная популяция, клетки которой не экспрессируют Т-кадгерин (B16F10 Т (-) сумм). Экспрессия Т-кадгерина в популяциях клеток B16F10 определяли методом иммуноблоттинга (Рисунок 3).

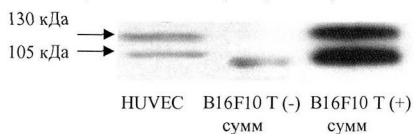


Рисунок 3. Экспрессия Т-кадгерина в суммарных популяциях клеток мышинной меланомы B16F10. Клетки HUVES использовали в качестве положительного контроля.

В результате клонирования клеток суммарных популяций было получено 6 клонов клеток мышинной меланомы B16F10 с разным уровнем экспрессии Т-кадгерина и один контрольный клон B16F10, клетки которого не экспрессируют Т-кадгерин

(Рисунок 4). Уровень экспрессии Т-кадгерина в полученных клонах определяли с помощью денситометрического анализа. Уровень экспрессии Т-кадгерина в контрольном клоне составляет 0,002 мм², тогда как в клонах, трансфицированных плазмидой, содержащей кДНК Т-кадгерина, этот уровень варьирует от 3,3 до 34 мм² (Рисунок 4Б).

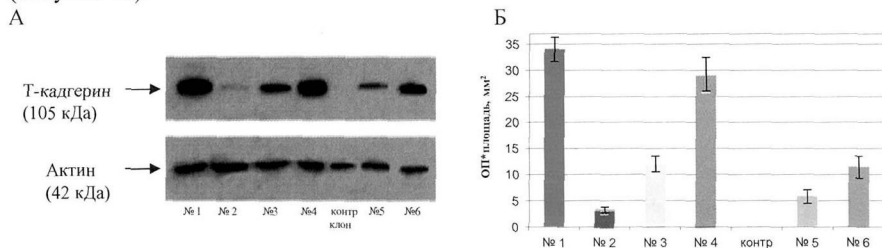


Рисунок 4. Экспрессия Т-кадгерина в клонах клеток мышиной меланомы B16F10. А – иммуноблоттинг лизатов клеток клонов мышиной меланомы B16F10, Б – денситометрический анализ экспрессии Т-кадгерина в клонах мышиной меланомы, выполненный с помощью программного обеспечения Quantity One 4.6. ОП – оптическая плотность, площадь – площадь одного пикселя.

Опираясь на данные денситометрического анализа, из полученной панели клонов было выбрано для дальнейших экспериментов 3 клона: контрольный клон B16F10 Т (-), клетки которого не экспрессируют Т-кадгерин, клон 2 B16F10 Т (+) с низким уровнем экспрессии Т-кадгерина и клон 1 B16F10 Т (++) с высоким уровнем экспрессии Т-кадгерина. В дальнейшем все эксперименты, за исключением модели хориоаллантоисной мембраны куриного эмбриона, выполнены на 3 клонах мышиной меланомы.

Исследование влияния экспрессии Т-кадгерина на пролиферацию клеток клонов мышиной меланомы *in vitro*. *In vitro* анализ пролиферации клеток клонов мышиной меланомы и построение кривых роста клонов проводили двумя методами: подсчетом абсолютного числа клеток с помощью прибора CellCounter (Рисунок 5А) и измерением клеточного индекса в режиме реального времени с помощью прибора xCELLigence (Рисунок 5Б).

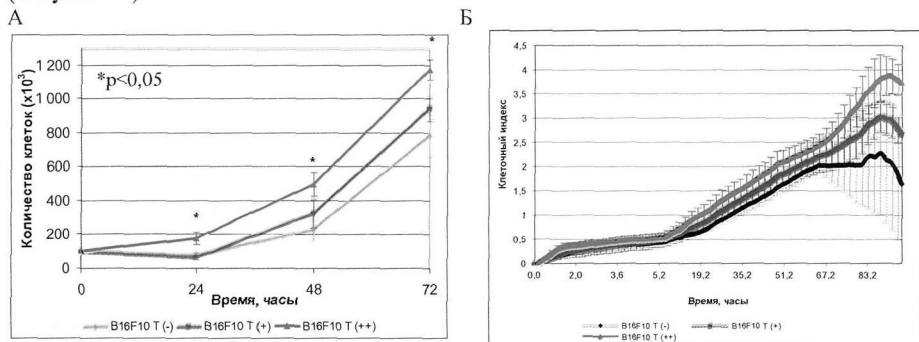


Рисунок 5. Кривые роста клонов мышиной меланомы B16F10: А - подсчет абсолютного числа клеток с помощью прибора CellCounter в течение 72 часов (n=5), Б - измерение клеточного индекса на приборе xCELLigence в течение 96 часов (n=3).

На основании данных, полученных при измерении клеточного индекса, были высчитаны времена удвоения для каждого клона (Таблица 1).

Таблица 1. Время удвоения популяций клеток клонов мышинной меланомы B16F10.

Клон клеток	Время удвоения, часы
B16F10 T (-)	31,7
B16F10 T (+)	29,8
B16F10 T (++)	28,4

Двумя методами анализа пролиферации было показано, что *in vitro* скорость роста клона с высокой экспрессией Т-кадгерина достоверно превышает скорость роста клона с низкой экспрессией Т-кадгерина и контрольного клона ($p < 0,05$). Таким образом, на основании данных *in vitro*, можно заключить, что экспрессия Т-кадгерина в клетках мышинной меланомы приводит к увеличению пролиферативной активности этих клеток за счет сокращения времени удвоения.

Исследование влияния экспрессии Т-кадгерина на распределение клеток клонов B16F10 по фазам клеточного цикла *in vitro*. Из данных литературы известно, что экспрессия Т-кадгерина может вызывать задержку в G_2 фазе клеточного цикла [Huang Z.Y. et al., 2003]. В связи с этим было проанализировано распределение клеток клонов мышинной меланомы по фазам клеточного цикла методом проточной цитометрии. В ходе анализа не было обнаружено достоверных различий между клонами мышинной меланомы по количеству клеток, находящихся на каждой из трёх исследованных фазах клеточного цикла, то есть изменение соотношения продолжительности индивидуальных фаз клеточного цикла обнаружено не было. Таким образом, экспрессия Т-кадгерина не приводит к изменению структуры клеточного цикла в клетках клонов мышинной меланомы B16F10.

Исследование влияния экспрессии Т-кадгерина на количество клеток клонов B16F10, находящихся на различных стадиях апоптоза и некроза, *in vitro*. Количество клеток на различных стадиях апоптоза и некроза в культуре клеток клонов мышинной меланомы определяли методом проточной цитометрии. Клетки позитивные и по аннексину V, и по 7-AAD считали клетками мёртвыми или находящимися на поздних стадиях апоптоза. Клетки, позитивные по Аннексину V, но негативные по 7-AAD считали клетками, находящимися на ранних стадиях апоптоза. Клетки, негативные по аннексину V и 7-AAD считали живыми. Было обнаружено, что процент мёртвых клеток и клеток на разных стадиях апоптоза в культуре достоверно не различается между клонами мышинной меланомы. Таким образом, экспрессия Т-кадгерина не влияет на количество мёртвых и апоптотических клеток B16F10 в культуре.

Исследование влияния среды роста клеток клонов B16F10 на МСК-ЖТ *in vitro*. В ходе эксперимента было обнаружено, что кондиционированная среда роста от клонов мышинной меланомы B16F10 вне зависимости от экспрессии Т-кадгерина стимулирует миграцию МСК-ЖТ по сравнению со средой роста эмбриональных фибробластов мыши NIH3T3 и стандартной средой с сывороткой для культивирования клеток ($p < 0,05$) (Рисунок 6А). Однако при гиперэкспрессии Т-кадгерина в клетках мышинной меланомы

стимулирующий эффект среды культивирования от клеток меланомы на миграцию МСК-ЖТ увеличивается в 1,4 раза по сравнению с контрольным клоном ($p < 0,05$) (Рисунок 6А). При анализе влияния Т-кадгерина в клетках меланомы на пролиферацию МСК-ЖТ было обнаружено, что среда роста от экспрессирующих Т-кадгерин клонов имеет тенденцию стимулировать пролиферацию клеток МСК-ЖТ, однако, достоверных отличий обнаружено не было ($p > 0,05$) (Рисунок 6Б).

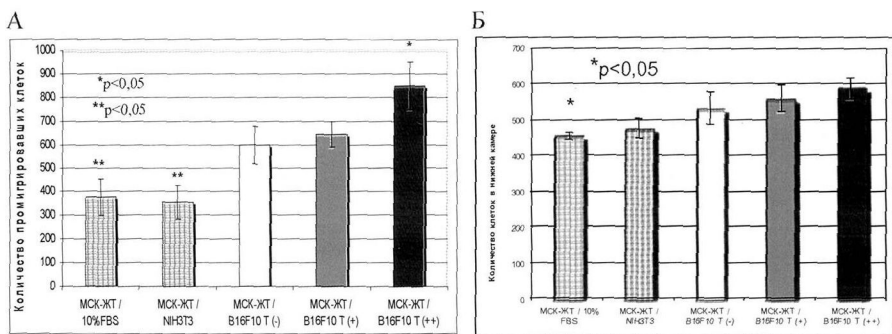


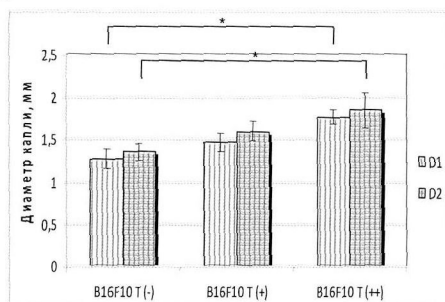
Рисунок 6. Влияние кондиционированной среды роста от клеток клонов мышиной меланомы B16F10 на МСК-ЖТ. А - влияние кондиционированной среды роста от клеток клонов мышиной меланомы на миграцию МСК-ЖТ: *достоверно по отношению к контрольному клону клеток, **достоверно по отношению к клонам мышиной меланомы. Б - влияние среды роста от клонов клеток мышиной меланомы на пролиферацию клеток МСК-ЖТ. *достоверно по отношению к клонам мышиной меланомы.

Так как было показано, что Т-кадгерин в клетках СНО, трансфицированных кДНК Т-кадгерина, способен слущиваться с поверхности и может присутствовать в кондиционированной среде [Vestal D.J., Ranscht B., 1992], мы проверили среду роста от клонов мышиной меланомы B16F10 и клеток NIH/3T3 на присутствие растворимой формы Т-кадгерина методом иммуноблоттинга. Т-кадгерина в среде роста от всех использованных типов клеток обнаружено не было. Методом иммуноблоттинга также не было выявлено экспрессии Т-кадгерина в клетках NIH/3T3 и МСК-ЖТ. Таким образом, высокий уровень экспрессии Т-кадгерина в клетках мышиной меланомы приводит к стимуляции миграции стромальных клеток (МСК-ЖТ) при бесконтактном сокультивировании, но не оказывает влияния на пролиферацию МСК-ЖТ в аналогичных условиях. Было сделано предположение, что клетки меланомы B16F10 секретируют в среду факторы, стимулирующие миграцию МСК-ЖТ.

Исследование влияния экспрессии Т-кадгерина на инвазивный потенциал клеток клонов B16F10 *in vitro*. Поскольку инвазия клеток меланомы из GFR Матригеля в полный Матригель сопровождается не только миграцией клеток, но и протеолитической активностью в отношении окружающего матрикса, что приводит к размыванию границы между двумя Матригелями и изменению диаметра капли, мы оценивали диаметры капли после 48 часов инкубации. При оценке влияния Т-кадгерина на инвазивный потенциал клеток мышиной меланомы было обнаружено, что диаметры капель Матригеля с клетками клона мышиной меланомы с высоким уровнем экспрессии Т-кадгерина достоверно больше по сравнению с каплями, в которые были помещены клетки контрольного клона или клона с низким уровнем экспрессии Т-кадгерина ($p < 0,05$) (Рисунок 7А). Также было обнаружено, что количество клеток клона мышиной

меланомы с высоким уровнем экспрессии Т-кадгерина, инвазивировавших из GFR Матригеля в полный Матригель, достоверно превышает аналогичный показатель для контрольного клона и клона с низким уровнем экспрессии Т-кадгерина ($p < 0,05$) (Рисунок 7Б). Таким образом, гиперэкспрессия Т-кадгерина в клетках мышиной меланомы приводит к увеличению инвазивного потенциала этих клеток.

А



Б

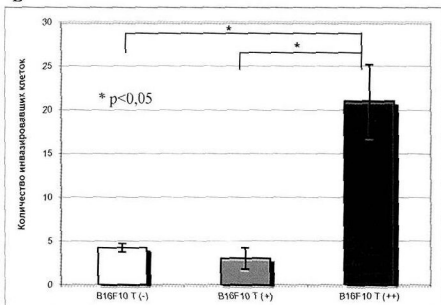


Рисунок 7. Влияние экспрессии Т-кадгерина на инвазивный потенциал клеток клонов мышиной меланомы B16F10, 48 часов инкубации: А – диаметры капли Матригеля с клетками клонов мышиной меланомы, Б – количество клеток клонов мышиной меланомы инвазивировавших полный Матригель с факторами роста из GFR Матригеля.

Исследование влияния экспрессии Т-кадгерина на профиль экспрессии клеток клонов B16F10 *in vitro*. Исследование влияния Т-кадгерина на профиль экспрессии клеток клонов мышиной меланомы проводили методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени (VEGF A, PDGF B, EGF, bFGF, HGF, uPAR, uPa, c-Met (HGFR), MMP2, MMP9), а также с использованием коммерческих наборов RT² Profiler PCR Array (внеклеточный матрикс и молекулы адгезии, ангиогенные факторы и ингибиторы ангиогенеза, хемокины и их рецепторы). Достоверных различий между контрольным клоном и экспрессирующими Т-кадгерин клонами B16F10 по уровню экспрессии следующих генов: VEGF A, PDGF B, bFGF, uPa, uPAR, MMP2 методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени обнаружено не было. мРНК EGF, HGF и MMP9 не детектируется ни в контрольном клоне, ни в Т-кадгерин-экспрессирующих кломах мышиной меланомы. Однако было выявлено, что гиперэкспрессия Т-кадгерина в клетках мышиной меланомы приводит к значительному увеличению экспрессии в этих клетках c-Met, рецептора HGF (Рисунок 8).

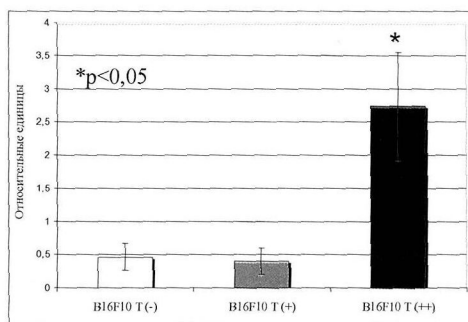


Рисунок 8. Экспрессия c-Met в кломах мышиной меланомы B16F10.

С помощью коммерческого набора RT² Profiler PCR Array для анализа экспрессии ангиогенных факторов и ингибиторов ангиогенеза было обнаружено, что экспрессия Т-кадгерина приводит к сильному увеличению (более чем в 4 раза) экспрессии 3-х генов: CXCL10, heparanase и Foxf1a. Экспрессия chromogranin A и procollagen type XVIII alpha 1 выявляется исключительно в экспрессирующих Т-кадгерин клонах мышиной меланомы и не детектируется в контрольном клоне мышиной меланомы. Также экспрессия Т-кадгерина приводит к небольшому увеличению (более чем в 2 раза) экспрессии 2-х генов: angiopoetin 2 и stabilin 1. Экспрессия Т-кадгерина вызывает значительное подавление экспрессии Tie 1. Также было обнаружено, что экспрессия TGF α присутствует только в контрольном клоне, тогда как в экспрессирующих Т-кадгерин клонах экспрессия TGF α не детектируется. С помощью коммерческого набора RT² Profiler PCR Array для анализа экспрессии хемокинов и их рецепторов было обнаружено, что экспрессия Т-кадгерина приводит к сильному увеличению (более чем в 4 раза) экспрессии одного гена - CXCL10. Небольшое увеличение экспрессии под влиянием экспрессии Т-кадгерина наблюдается для генов Ccl5, Cmtm 3, Nfkb 1 и Xcl1 11. Экспрессия Ccl 7, Gdf 5 и Il8ra выявляется исключительно в Т-кадгерин экспрессирующих клонах мышиной меланомы и не детектируется в контрольном клоне мышиной меланомы. Также было обнаружено, что экспрессия Т-кадгерина приводит к подавлению экспрессии Ccl 9, Il8rb, interleukin 16 и interleukin 4. С помощью коммерческого набора RT² Profiler PCR Array для анализа экспрессии молекул внеклеточного матрикса и молекул адгезии было обнаружено, что экспрессия Т-кадгерина приводит к сильному увеличению (более чем в 4 раза) экспрессии одного гена - cadherin 1. Также экспрессия Т-кадгерина приводит к небольшому увеличению (более чем в 2 раза) экспрессии 6 генов: Tgfb1, MMP14, integrin alpha 5, integrin alpha v, integrin beta 3 и integrin alpha E. Экспрессия Pecam 1, Adamts 2 и Lama 3 выявляется исключительно в Т-кадгерин экспрессирующих клонах мышиной меланомы и не детектируется в контрольном клоне мышиной меланомы. Также обнаружено, что экспрессия Т-кадгерина приводит к подавлению экспрессии 2-х генов: Adamts 5 и Lamb 3.

Исследование влияния экспрессии Т-кадгерина на рост первичного узла гематогенно метастазирующей в лёгкие мышиной меланомы B16F10. На этой модели были проанализированы характеристики роста подкожного первичного узла (размер, васкуляризация и вклад стромального компонента в рост), а также оценивали частоту метастазирования. Влияние Т-кадгерина на рост первичного узла оценивали по анализу кинетики роста опухолей в течение 28 суток (7 измерений). При имплантации клеток с высоким уровнем экспрессии Т-кадгерина наблюдали достоверно наиболее быстрый рост в сравнении с первичными узлами, образованными клетками с низким уровнем экспрессии Т-кадгерина или контрольными клетками ($p < 0,05$) (Рисунок 9). К окончанию эксперимента размер первичного узла, образованного клетками мышиной меланомы с высоким уровнем экспрессии Т-кадгерина, достиг 12068 мм³. Тогда как для первичных узлов, образованных клетками мышиной меланомы B16F10 с низким уровнем экспрессии Т-кадгерина и клетками контрольного клона этот размер составил 9855 мм³ и 4992 мм³, соответственно. Достоверные увеличение скорости роста наблюдали также у первичных узлов, образованных B16F10 Т (+) клетками, по отношению к первичным узлам, сформированных B16F10 Т (-) клетками ($p < 0,05$) (Рисунок 9).

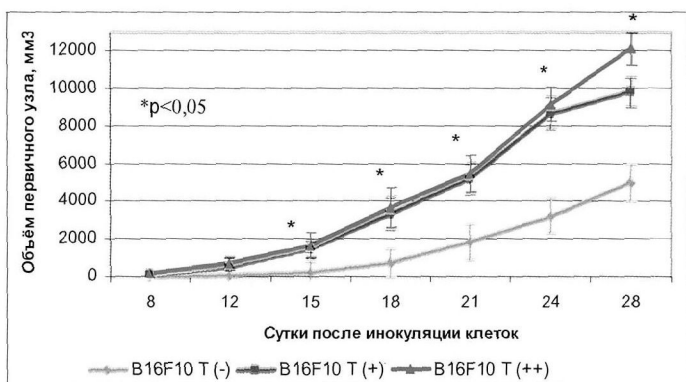


Рисунок 9. Кинетика роста первичных узлов мышиной меланомы B16F10 под кожей мышей BDF1.

Таким образом, экспрессия Т-кадгерина в клетках мышиной меланомы приводит к увеличению скорости роста первичного узла, образованного этими клетками *in vivo*. Усиление роста первичных узлов *in vivo*, образованных экспрессирующими Т-кадгерин клетками, может быть объяснено усилением пролиферативного потенциала этих клеток, что показано нами *in vitro*. При анализе криосрезов первичных узлов мышиной меланомы было обнаружено, что гистологическое строение первичных узлов, образованных Т-кадгерин экспрессирующими клетками, значительно отличается от строения узлов, образованных контрольными клетками. На окрашенных гематоксилином срезах было обнаружено, что значительную долю первичных узлов, образованных Т-кадгерин экспрессирующими клетками, занимают очаги некроза, тогда как в первичных узлах, образованных контрольным клоном клеток, количество таких очагов достоверно меньше ($p<0,05$) (Рисунок 10).

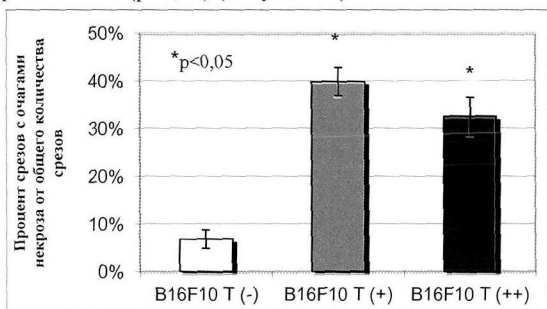


Рисунок 10. Частота очагов некроза на срезах первичных узлов меланомы B16F10 у мышей (n=150).

Таким образом, экспрессия Т-кадгерина в клетках мышиной меланомы приводит к увеличению количества очагов некроза в первичных узлах, образованных экспрессирующими Т-кадгерин клетками. Однако в настоящей работе было показано, что экспрессия Т-кадгерина в клетках меланомы B16F10 *in vitro* не влияет на количество мёртвых клеток и клеток на разных стадиях апоптоза. Мы предположили, что увеличение некротической гибели клеток первичного узла может быть связано с его недостаточным кровоснабжением.

Исследование влияния экспрессии Т-кадгерина на васкуляризацию первичных узлов мышинной меланомы. Для проверки предположения о влиянии экспрессии Т-кадгерина в клетках меланомы на васкуляризацию первичного узла было проведено окрашивание первичных узлов на маркёр эндотелиальных клеток с последующим подсчётом количества сосудов различного диаметра (CD31 – окрашивание) (Рисунок 11А). Было обнаружено, что количество сосудов среднего диаметра и капилляров на срезах первичных узлов, образованных экспрессирующими Т-кадгерин клетками, достоверно меньше, чем в случае первичных узлов, образованных контрольными клетками мышинной меланомы ($p < 0,05$) (Рисунок 11Б).

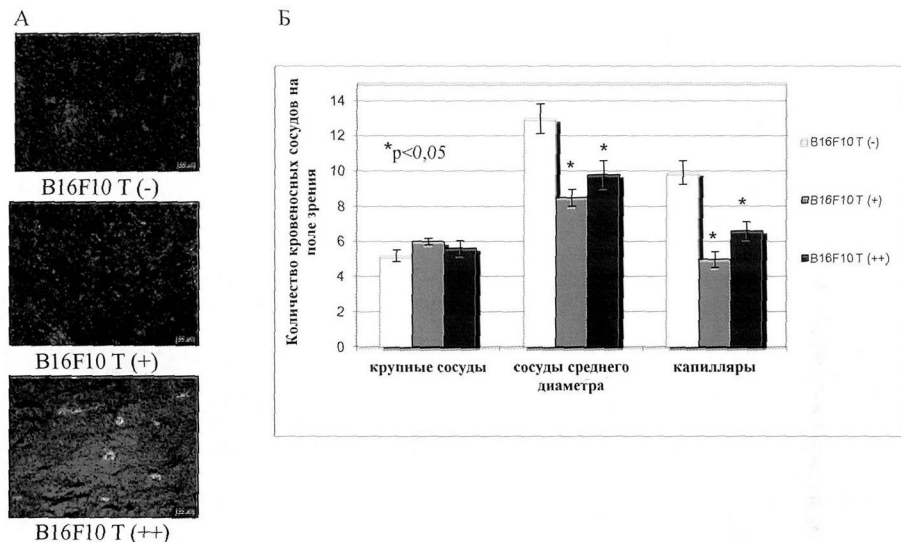


Рисунок 11. Васкуляризация первичного узла меланомы у мышей сосудами различного диаметра ($n=150$). А – иммунофлуоресцентная окраска криосрезов первичных узлов мышинной меланомы антителами к CD31, Б – подсчёт сосудов различного диаметра на криосрезах первичных узлов мышинной меланомы.

Очевидно, что экспрессия Т-кадгерина в клетках мышинной меланомы B16F10 приводит к подавлению васкуляризации сосудами среднего диаметра и капиллярами первичных узлов, образованных клетками, экспрессирующими Т-кадгерин. Недостаточное кровоснабжение отдельных участков первичных узлов при экспрессии Т-кадгерина, возможно, и является причиной усиления некротической гибели клеток таких узлов. В настоящей работе при анализе экспрессии генов, вовлечённых в процесс ангиогенеза, в клетках клонов мышинной меланомы было обнаружено повышение экспрессии некоторых ингибиторов ангиогенеза при экспрессии Т-кадгерина: CXCL 10, или IP-10 [Angiolillo A.L. et al., 1995, Strieter R.M. et al., 1995, Strieter R.M. et al., 2005]; angiopoietin 2 [Maisonpierre P.C. et al., 1997, Cao Y. et al., 2007]; procollagen type XVIII alpha 1, предшественник ингибитора ангиогенеза - эндостатина [O'Reilly M.S. et al., 1997]; chromogranin A, предшественник ингибитора ангиогенеза вазостатина-1 [Belloni D. et al., 2007, Veschini L. et al., 2011]. Также было отмечено подавление экспрессии двух стимуляторов ангиогенеза в клетках мышинной меланомы, экспрессирующих Т-кадгерин: TGF α [Leker R.R. et al., 2009] и Tie-1 [Korhonen J. et al., 1994, Sato M. et al., 1993]. Таким образом, при экспрессии Т-кадгерина в клетках меланомы изменяется соотношение факторов, подавляющих и активирующих ангиогенез, в пользу

ингибиторов ангиогенеза, что, возможно, обуславливает снижение способности этих клеток стимулировать проращение сосудов в опухоль.

Исследование влияния экспрессии Т-кадгерина на вклад стромального компонента в формирование первичных узлов мышиной меланомы B16F10. Поскольку известно, что мезенхимальные стромальные клетки могут вносить свой вклад в опухолевый рост, в настоящем исследовании мы оценили вклад стромального компонента в формирование первичного узла путем окрашивания криосрезов на маркер активированной стромы CD90 (Рисунок 12А) и анализа площади, занимаемой стромальным компонентом (CD90+ зоны). Было обнаружено, что на срезах первичных узлов, образованных экспрессирующими Т-кадгерин клетками мышиной меланомы, CD90-позитивные области занимают достоверно большую площадь, чем в случае первичных узлов, сформированных контрольными клетками ($p < 0,05$) (Рисунок 12Б).

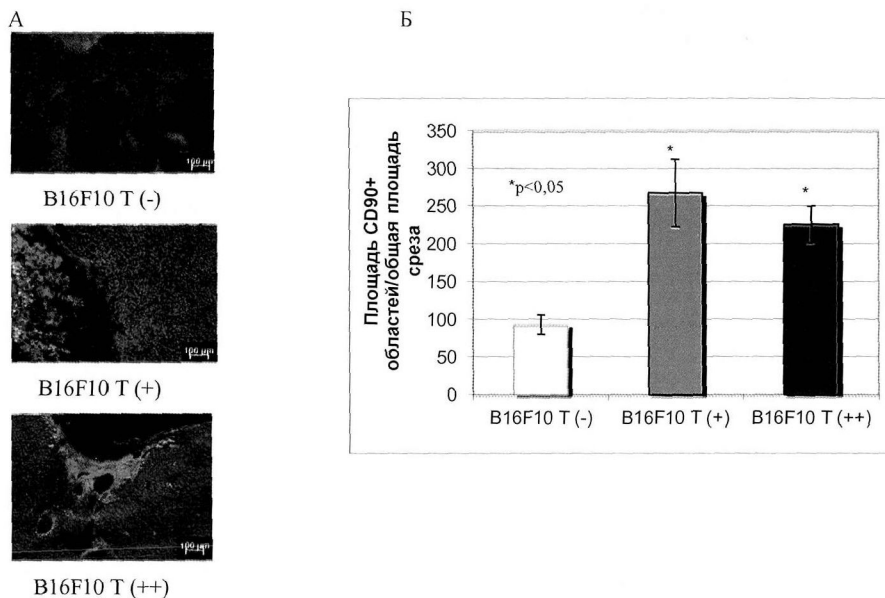


Рисунок 12. Оценка вклада стромального компонента в формирование первичного узла меланомы B16F10 ($n=150$). А – иммунофлуоресцентное окрашивание криосрезов первичных узлов меланомы антителами к CD90, Б – площадь CD90+ областей на срезах первичных узлов меланомы у мышей.

Данные экспериментов *in vitro* по анализу миграции стромальных клеток в ответ на стимулирование средой культивирования от клеток меланомы B16F10, а также результаты, полученные при анализе CD90+ областей на срезах первичных узлов меланомы *in vivo*, свидетельствуют о том, что экспрессия Т-кадгерина в клетках мышиной меланомы приводит к активации и миграции клеток стромы. Кроме того, экспрессия Т-кадгерина вызывает увеличение экспрессии ряда хемокинов: CXCL 10, CCL5, CXCL 11, CCL7, которые являются хемоаттрактантами не только для иммунных, но и для мезенхимальных стромальных клеток [Spaeth E. et al., 2008]. Также методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени было выявлено достоверное увеличение

экспрессии с-Met, рецептора HGF, в клетках меланомы, гиперэкспрессирующих Т-кадгерина, в то время как мРНК самого HGF не детектировалась ни в одном из клонов меланомы. Ранее в нашей лаборатории было показано методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени, что МСК-ЖТ экспрессируют HGF, причем его экспрессия значительно увеличивается при гипоксии [Efimenko A. Iu. et al., 2010]. Мы предполагаем, что экспрессия Т-кадгерина в клетках мышинной меланомы приводит к увеличению продукции ими хемокинов в первичном узле, по градиенту которых приходят МСК. Приходя в опухоль, МСК оказываются в гипоксических условиях, что вызывает в них усиление экспрессии HGF. HGF, связываясь со своим рецептором с-Met на поверхности клеток меланомы, гиперэкспрессирующих Т-кадгерин, запускает сигнальный каскад в опухолевых клетках, приводящий, по данным литературы, к стимуляции роста меланомы и увеличению инвазивного потенциала [Nakamura T., 1991, Halaban R. et al., 1993, Matsumoto K. et al., 1991].

Исследование влияния экспрессии Т-кадгерина на метастазирование мышинной меланомы B16F10. Одной из ключевых характеристик опухолевой прогрессии является частота метастазирования. Для оценки параметров метастазирования (частоты метастазирования и лёгочного коэффициента) на 29 сутки мышей умерщвляли, извлекали лёгкие, взвешивали и тестировали их на наличие метастаз. Было обнаружено, что в группе мышей, которым были введены клетки с высоким уровнем экспрессии Т-кадгерина, частота метастазирования была значительно выше (Таблица 2).

Таблица 2. Частота метастазирования мышинной меланомы B16F10 с разным уровнем экспрессии Т-кадгерина (n=11).

Клон клеток	Число мышей с метастазами / общее число мышей	Процент мышей с метастазами
B16F10 T (-)	1/11	9,1 %
B16F10 T (+)	2/11	18,2 %
B16F10 T (++)	6/11	54,5 %

Показано, что экспрессия Т-кадгерина в клетках мышинной меланомы B16F10 приводит к увеличению частоты метастазирования *in vivo*. При анализе экспрессии генов молекул адгезии и внеклеточного матрикса в клетках клонов мышинной меланомы с помощью коммерческих наборов PCR Аггау было обнаружено повышение экспрессии ряда проонкогенных интегринов в экспрессирующих Т-кадгерин клетках: integrin $\alpha 5$, integrin αV , integrin αE , integrin $\beta 3$, а также MMP14. Мы предполагаем, что увеличение экспрессии этих молекул может приводить к усилению метастазирования *in vivo*. Эти данные коррелируют с результатами, полученными другими авторами, которые обнаружили, что активация MMP14 в клетках меланомы приводит к усилению инвазии этих клеток на коллагеновом матриксе [Hotary K.B. et al., 2003]. Кроме того, было показано, что гиперэкспрессия $\beta 3$ субъединицы интегрин в клетках меланомы на ранней стадии радиального роста индуцирует вступление меланомы в фазу вертикального роста, характеризующуюся усиленным ростом, инвазией и метастазированием [Hsu M.Y. et al., 1998].

Влияние экспрессии Т-кадгерина на неоангиогенез в меланоме B16F10 на модели хорнлоантоисной мембраны куриного эмбриона. Было исследовано количество сосудов, подрастающих к опухолевым массам, сформированным суммарной популяцией Т-кадгерин гиперэкспрессирующих (B16F10 Т (+) сумм) и контрольных (B16F10 Т (-) сумм) клеток мышинной меланомы. Средний показатель числа сосудов, подрастающих к опухолевым массам, сформированным гиперэкспрессирующими Т-кадгерин клетками, равен 3,1, аналогичный же показатель для опухолевых масс, сформированных контрольными клетками, равен 7,1 ($p < 0,01$) (Рисунок 13).

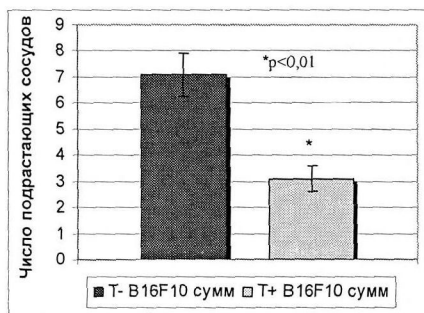


Рисунок 13. Число сосудов, подрастающих к опухолевым массам, сформированными гиперэкспрессирующими Т-кадгерин (Т+ B16F10 сумм) и контрольными (Т- B16F10 сумм) клетками мышинной меланомы B16F10.

Полученные в работе данные показывают, что Т-кадгерин является важным регулятором прогрессии меланомы B16F10. Экспрессия Т-кадгерина в клетках мышинной меланомы приводит к усилению их пролиферативной активности и инвазивного потенциала. При введении клеток мышинной меланомы, экспрессирующих Т-кадгерин, мышам подкожно они формируют первичные узлы, в которых подавлена неоваскуляризация, но наблюдается значительное содержание мезенхимальных стромальных клеток. Кроме того, клетки мышинной меланомы с гиперэкспрессией Т-кадгерина обладают большей спонтанной метастатической активностью.

ВЫВОДЫ

1. Наличие в клетках мышиной метастазирующей меланомы B16F10 гиперэкспрессии Т-кадгерина приводит к достоверному ускорению пролиферации клеток *in vitro* в 1,5 раза ($p<0,05$), а также достоверному ускорению роста первичного узла под кожей у мышей BDF1 в 2,4 раза ($p<0,05$) и экспрессии рецептора фактора роста гепатоцитов c-Met в 6 раз ($p<0,05$).
2. Экспрессия Т-кадгерина в клетках мышиной меланомы B16F10 сопряжена с достоверным подавлением прорастания в ткань первичного узла кровеносных сосудов среднего диаметра (в 1,4 раза) и капилляров (в 1,7 раз) ($p<0,05$) *in vivo* на модели метастазирующей в легкие меланомы B16F10 у мышей, а также с подавлением в 2,3 раза ($p<0,01$) врастания кровеносных сосудов *in vivo* в узел меланомы на модели хориоаллантоисной мембраны куриного эмбриона.
3. В клетках мышиной меланомы B16F10, экспрессирующих Т-кадгерин, происходит увеличение экспрессии ингибиторов ангиогенеза (CXCL 10, angiopoietin 2, procollagen type XVIII alpha 1, chromogranin A) и подавление экспрессии стимуляторов ангиогенеза (TGF α и Tie-1).
4. Клетки мышиной меланомы B16F10, экспрессирующие Т-кадгерин, вызывают усиление миграции стромальных клеток *in vitro* ($p<0,05$) и увеличение содержания CD90-позитивных клеток активированной стромы в первичном подкожном опухолевом узле у мышей BDF1 *in vivo* ($p<0,05$).
5. При экспрессии Т-кадгерина в клетках мышиной меланомы происходит увеличение экспрессии хемокинов CXCL 10, CCL5, CXCL 11, CCL7, выполняющих роль хемоаттрактантов для мезенхимальных стромальных клеток.
6. Инвазивный потенциал *in vitro* и метастатический потенциал клеток мышиной метастазирующей меланомы B16F10 *in vivo* возрастают при экспрессии Т-кадгерина ($p<0,05$).
7. При экспрессии Т-кадгерина в клетках мышиной меланомы происходит увеличение экспрессии факторов, вовлечённых в процесс инвазии и метастазирования: integrin $\alpha 5$, integrin αV , integrin αE , integrin $\beta 3$ и MMP14.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Юрлова Е.И.**, Рубина К.А., Сысоева В.Ю., Шаронов Г.В., Сёмина Е.В., Парфёнова Е.В., Ткачук В.А. Т-кадгерин подавляет пролиферацию клеток мышинной меланомы B16F10 *in vitro* и опухолевый ангиогенез на модели хориоаллантоисной мембраны куриного эмбриона. Онтогенез. 2010; 41 (4): 261-270.
2. Rubina K., Syssoeva V., Semina E., Kalinina N., **Yurlova E.**, Khlebnikova A., Molochkov V.. Malignant transformation in skin is associated with the loss of T-cadherin expression in human keratinocytes and heterogeneity in T-cadherin expression in tumor vasculature. Tumor Angiogenesis. Под редакцией Ran S. (INTECH). 2011: 123-155.
3. Rubina K.A., Syssoeva V.Yu., **Yurlova E.I.**, Talovskaya E.V., Andronova N.V., Treshalina H.M., Parfyonova Ye.V., Tkachuk V.A. T-cadherin expression in murine melanoma suppresses neovascularization in chorioallantoic membrane model. Сборник тезисов 3-ей Международной конференции по ангиогенезу, Амстердам, Нидерланды, 1-3 марта 2007 г. С. 69.
4. **Юрлова Е.И.** Исследование роли Т-кадгерина в опухолевом ангиогенезе *in vivo* и росте опухолевых клеток *in vitro*. Сборник тезисов 15 Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2008», Москва, 8-11 апреля 2008 г. С. 251-252.
5. **Юрлова Е.И.**, Сысоева В.Ю., Рубина К.А. Исследование роли Т-кадгерина в опухолевом ангиогенезе на модели хорио-аллантоидной мембраны куриного зародыша и росте опухоли *in vitro*. Вестник Российской академии медицинских наук. 2008; 6. Тезисы докладов V конференции молодых учёных России с международным участием «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины», Москва, 19-22 мая 2008 г. С. 498-499.
6. **Юрлова Е.И.** Исследование роли Т-кадгерина в опухолевом ангиогенезе на модели хорио-аллантоидной мембраны куриного эмбриона. Сборник тезисов XV Школы «Актуальные проблемы биологии развития», Звенигород, 19-24 октября 2008 г. С. 117-119.
7. Рубина К.А., Сысоева В.Ю., Калинин Н.И., **Юрлова Е.И.**, Потехина А.В., Ефименко А.Ю., Андропова Н.В., Трещалина Е.М., Парфёнова Е.В., Ткачук В.А. Подавление опухолевого ангиогенеза с использованием плазмидного вектора, содержащего кДНК для экспрессии Т-кадгерина. Сборник тезисов Всероссийской научной конференции с международным участием «Нанотехнологии в онкологии 2008», Москва, 6 декабря 2008 г. С.164.
8. **Юрлова Е.И.** Исследование механизма подавления роста опухоли и опухолевого ангиогенеза при гиперэкспрессии Т-кадгерина. Сборник тезисов 16 Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2009», Москва, 13-18 апреля 2009 г. С. 319.
9. Rubina K., Syssoeva V., **Yurlova E.**, Semina E., Parfyonova Y., Tkachuk V. T-cadherin overexpression suppresses proliferation and increase differentiation of murine melanoma cells in culture. Сборник тезисов ежегодной конференции Международного Общества геной и клеточной терапии (ISCGT), Корк, Ирландия, 2-4 сентября 2009 г. С. 21.
10. **Yurlova E.**, Rubina K., Syssoeva V., Semina E., Parfyonova Y., Tkachuk V. T-cadherin overexpression in culture of murine melanoma cells suppresses proliferation. The FEBS Journal. 2010. 277 (Suppl 1, 35th FEBS Congress "Molecules of life"):163.
11. **Юрлова Е.И.**, Рубина К.А., Сысоева В.Ю., Ткачук В.А. Использование плазмидного вектора, содержащего кДНК Т-кадгерина, для изменения профиля экспрессии клеток мышинной меланомы. Сборник тезисов конференции с Международным участием «Нанотехнологии в онкологии 2010», Москва, 30 октября 2010 г. С. 71-73.
12. **Юрлова Е.И.**, Рубина К.А., Сысоева В.Ю., Ткачук В.А. Экспрессия Т-кадгерина в клетках меланомы стимулирует миграцию мезенхимальных стромальных клеток при сокультивировании. Сборник тезисов IV Всероссийской научной школа-конференция «Стволовые клетки и регенеративная медицина», Москва, 24-27 октября 2011г. С. 85-86.

Юрлова Екатерина Ивановна "Механизмы влияния Т-кадгерина на рост, метастазирование и васкуляризацию меланомы"

Цель работы заключалась в выявлении возможных механизмов участия Т-кадгерина в росте, васкуляризации и метастазировании мышинной меланомы *in vivo*, а также в оценке его влияния на пролиферативные и инвазивные свойства клеток мышинной меланомы B16F10 *in vitro* и профиль экспрессии факторов, регулирующих ангиогенез, миграцию и инвазию *in vitro*. Обнаружено, что экспрессия Т-кадгерина в клетках мышинной меланомы B16F10 приводит к увеличению пролиферативной активности клеток *in vitro* и стимуляции роста меланомы у мышей с увеличением зоны некроза первичного узла. Показано, что экспрессия Т-кадгерина коррелирует с подавлением неоваскуляризации меланомы, что проявляется в уменьшении числа прорастающих в опухоль сосудов различного диаметра. Ингибирующее влияние экспрессии Т-кадгерина на неоангиогенез в опухоли подтверждено на модели хориоаллантоисной мембраны куриного эмбриона. Обнаружено также, что экспрессия Т-кадгерина в клетках меланомы B16F10 приводит к увеличению количества CD90-позитивных клеток в составе первичного узла *in vivo*, что коррелирует со стимуляцией миграции мезенхимальных стромальных клеток. Выявлено, что клетки мышинной меланомы B16F10 экспрессирующие Т-кадгерин, достоверно интенсивнее метастазируют *in vivo* и обладают более выраженным инвазивным потенциалом *in vitro*. Анализ профиля прорастающих хемокинов, а также факторов, регулирующих ангиогенез и адгезию показал, что в клетках мышинной меланомы B16F10, экспрессирующих Т-кадгерин, повышен уровень экспрессии ряда хемокинов, стимулирующих миграцию мезенхимальных стромальных клеток, проонкогенных интегринов и ингибиторов ангиогенеза. Таким образом, проведенное исследование позволило установить, что Т-кадгерин участвует в регуляции роста, метастазирования и васкуляризации мышинной меланомы B16F10, проявляя свойства фактора прогрессии опухоли.

Yurlova Ekaterina Ivanovna "Mechanisms of the effect of T-cadherin on growth, metastasis and vascularization of melanoma"

The aim of the present study was to identify the possible mechanisms for the participation of T-cadherin in the growth, vascularization and metastasis of murine melanoma B16F10 *in vivo*, as well as to assess the impact of T-cadherin on cell proliferation, the ability of melanoma cells for invasion *in vitro* and their expression profile of the factors that regulate angiogenesis, migration, and invasion *in vitro*. It was found that the expression of T-cadherin in melanoma cells leads to increased cell proliferation activity *in vitro* and the increase in the size of the primary nodule; however this was accompanied by increased necrotic cell death *in vivo*. It was shown that the expression of T-cadherin is correlated with the suppressed neovascularization of the primary melanoma resulting in a decrease in the number of tumor-penetrating blood vessels of different diameters. Inhibitory effect of T-cadherin on tumor angiogenesis was also confirmed using the model of chorioallantoic membrane of chick embryo. Also it was shown that T-cadherin expression in melanoma cells leads to an increase in the number of CD90-positive cells in the primary site *in vivo*, which correlates with the ability of T-cadherin expressing melanoma to stimulate the migration of mesenchymal stromal cells. In addition, it appeared that T-cadherin-expressing melanoma cells displayed increased metastatic potential *in vivo* and have more invasive potential *in vitro* compared with control cells. When analyzing the expression profile of chemokines, as well as factors that regulate angiogenesis and adhesion, it was found that T-cadherin-expressing melanoma cells exhibit elevated level of expression of several chemokines that stimulate migration of mesenchymal stromal cells, prooncogenic integrins and angiogenic inhibitors compared with control cells. Thus, we have shown that T-cadherin is involved in regulation of growth, metastasis and vascularization of murine melanoma act as tumor progression factor.

Подписано в печать: 03.11.2011

Заказ № 6194 Тираж - 100 экз.

Печать трафаретная.

Типография «11-й ФОРМАТ»

ИНН 7726330900

115230, Москва, Варшавское ш., 36

(499) 788-78-56

www.autoreferat.ru