

Інститут молекулярної
біології і генетики НАН
України, Київ, Україна

Ключові слова: епітеліально-мезенхімальна трансформація (EMT), канцерогенез, метастазування, E-кадгерин-бета-катенін, Wnt-бета-катенін.

ЕПІТЕЛІАЛЬНО-МЕЗЕНХІМАЛЬНА ТРАНСФОРМАЦІЯ В КАНЦЕРОГЕНЕЗІ

Резюме. У концепції мікрооточення пухлини ключовим феноменом є епітеліально-мезенхімальна трансформація (EMT). EMT — механізм тканино-специфічного морфогенезу та органогенезу, що має місце в процесах ембріонального розвитку та пов'язаний із морфогенезом епітеліальних клітин у мезенхімальні. У канцерогенезі EMT зводиться до химерного «органогенезу», що проявляється метастазуванням пухлин. Тому пухлиноасоційована EMT — це аномальна клітинна програма, яка відкриває шлях до міграційних, інвазивних та метастазуючих властивостей ракових клітин. Цей процес підпорядковується, зокрема, епігенетичному контролю та реалізується на різних етапах клітинного диференціювання із залученням багатьох сигнальних шляхів, з яких ключове місце займає канонічний Wnt-бета-катеніновий сигналінг. Останній може розглядатися як нова мішень при епігенетичній дерегуляції EMT у канцерогенезі.

ВСТУП

Епітеліально-мезенхімальна трансформація (EMT) — висококонсервативна клітинна програма, що веде до перетворення поляризованих адгезивних епітеліальних клітин у рухливі, морфологічно змінені стовбурові мезенхімальні клітини [1]. Цей важливий процес за фізіологічних умов відбувається на ранніх стадіях ембріогенезу та морфогенезу [2]. Пізніше EMT була ідентифікована як механізм запуску інвазії та метастазування ракових клітин [3]. Ключові сигнальні шляхи, що відповідають за індукцію EMT в ембріогенезі, залучаються до процесів пухлинної інвазії та метастазування (рис. 1). Серед них показано, що Wnt-β-катеніновий сигналінг, TGF-β сигналінг та Notch сигналінг на пізніх стадіях пухлинної прогресії промотують EMT у ракових клітинах, надаючи їм здатності до інвазії [4].

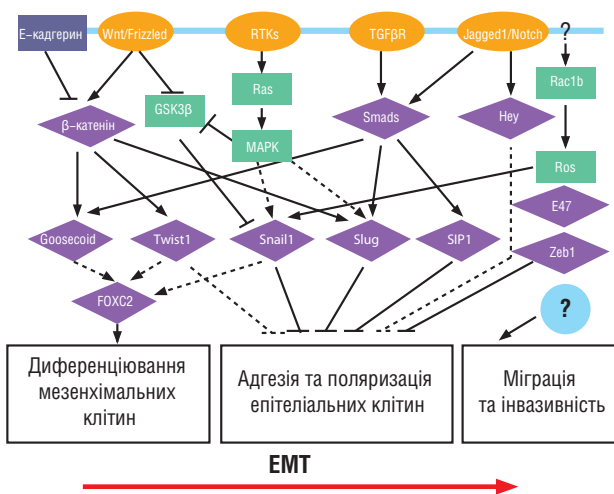


Рис. 1. Сигнальні молекулярні шляхи та транскрипційні фактори, що регулюють програму EMT у ракових клітинах [4]

Динамічні зв'язки між регуляторами адгезії та ядерними регуляторами займають важливе місце в EMT програмуванні при канцерогенезі. Саме канонічний Wnt сигнальний шлях і втрата E-кадгерину — ключового маркера епітеліальних клітин — залучені до ядерної активації бета-катеніну, що в свою чергу індукує EMT-асоційовані транскрипційні фактори, такі як Snail, Slug, Zeb1, Zeb2, Twist1 [5]. Окрім того, TGF-β сигнальний шлях також активує EMT-індукуючі транскрипційні фактори, включаючи Slug, SIP1 і Gooseoid, у поєднанні з активацією Smads [6, 7]. Опосередковано Notch сигнальний шлях активується за рахунок TGF-β-індукованої EMT [4].

Більшість маркерів, що експресуються окремо в епітеліальних (цитокератин 18, муцин Мис-1, десмоплакін) або мезенхімальних (віментин, фібрoneктин) клітинах, не можуть бути повністю адекватними для прогнозування EMT у раковій прогресії. Пухлинні клітини, що проходять через стадію EMT, імовірно, ідентифікуються за експресією генів вищенаведених транскрипційних факторів — молекулярних індукторів EMT — Snail, Slug, Zeb1, SIP1 (Zeb2), Twist1, Gooseoid, що можуть набувати безпосереднього діагностичного значення.

У клітинних механізмах EMT епігенетична регуляція займає ключове місце та поєднується із порушенням епігенетичного контролю, перш за все Wnt-beta-катенін сигнального шляху, а саме — його аберантної активації при канцерогенезі, що супроводжує метастатичний потенціал пухлинних клітин. З активацією Wnt-beta-катенінового сигнального шляху безпосередньо асоціюється аберантне промоторне гіперметилування гена E-кадгерину при різних типах новоутворень, у тому числі лейкемії [8, 9]. Це призводить до пригнічення його транскрипції та, як наслідок, втрати адгезивного

молекулярного міжклітинного сигналіну, натомість, до ядерної транслокації та активації бета-катеніну у складі Wnt-beta-катенінового сигнального шляху [10]. Таке «переключення» епітеліального E-кадгерин-бета-катенінового адгезивного комплексу на ядерний Wnt-beta-катенін сигнальний шлях проліферації мезенхімальних стовбурових клітин можна вважати ключовим феноменом ЕМТ в еволюції пухлиноасоційованих стовбурових клітин. Подібні сигнальні шляхи та їх регуляція, асоційовані з появою пухлинних стовбурових клітин, привертають увагу як потенційні мішені в стратегії сучасної терапії раку.

1. ГЕТЕРОГЕННІСТЬ КЛІТИННОГО СКЛАДУ ПУХЛИНИ

Важливою відмінною рисою пухлин є гетерогенність клітинного складу [11]. Незважаючи на те що підтипи нормальних клітин всередині органа морфологічно подібні, неопластичні клітини всередині пухлини різуче відрізняються. Так, вони можуть бути гетерогенними за розміром, з великою кількістю ядер, різноманітними за формою і здатністю до специфічного забарвлення. Морфологічна гетерогенність є важливим критерієм класифікації пухлин. Можна припустити, що вона впливає з функціональної гетерогенності в геномі пухлин. Так, різні хромосомні аномалії наявні в усіх типах ракових клітин [12], а анеуплоїдію свого часу вважали достатньою для пояснення генетичної нестабільності без наявності генетичних мутацій [13]. Дійсно, зміни в хромосомах можуть охоплювати не лише мільйони нуклеотидів, а й окремі функціональні райони хромосом, таким чином ускладнюючи пошук специфічних мутацій для тих чи інших типів пухлин. ЕМТ є новим встановленим феноменом у механізмі гетерогенності пухлин.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФОЛОГІЧНИХ ОЗНАК ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ І МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ КЛІТИН

Епітеліальні та мезенхімальні клітини є двома найпоширенішими типами клітин у ссавців. Епітеліальні клітини характеризуються когезивною взаємодією між клітинами, формуванням безперервних шарів клітин, наявністю трьох мембранних доменів — апікального, латерального і базального, наявністю щільних контактів між апікальними і латеральними доменами, апікобазальним розподілом і полярністю різноманітних органел та компонентів цитоскелета [14]. Мезенхімальні клітини відрізняються від епітеліальних насамперед тим, що не здатні утворювати впорядкований безперервний шар клітин, не мають чітко вираженої апікобазальної поляризації, є рухливими клітинами, що можуть набувати інвазивних властивостей [15]. Упродовж ембріонального розвитку та морфогенезу відбувається епітеліальна трансформація пулу клітин у мезенхімальні за рахунок феноме-

ну ЕМТ [2], що сприяє формуванню тришарового ембріона в процесі гастрულляції. ЕМТ є ключовою у таких гістогенетичних процесах, як формування серця, органів опорно-рухової системи і більшості периферичних нервів [16]. У деяких випадках може відбутися зворотній перехід — мезенхімально-епітеліальна трансформація.

Аберантна клітинна програма, яка призводить до ЕМТ феномену протягом канцерогенезу, характеризується посиленням лише певних аспектів повноцінної програми ЕМТ у процесі ембріонального розвитку [14].

3. ВТРАТА ЕПІТЕЛІАЛЬНОГО ФЕНОТИПУ ПРИ ЕМТ І РОЛЬ Е-КАДГЕРИНУ

Білок Е-кадгерин має важливе значення у формуванні та підтриманні ембріональних епітеліальних клітин. Пригнічення його експресії є невід'ємною частиною деяких морфогенетичних процесів всередині ембріона, більшість з яких зумовлені ЕМТ [17].

Транскрипційні фактори Snail і Slug наявні в недиференційованій мезодермі й тканинах, де відбувається ЕМТ, а саме: нервового гребеня і первинної смужки. Ці дані узгоджуються з відомостями про те, що транскрипційний фактор Snail пригнічує експресію гена Е-кадгерину в ділянках, що проходять ЕМТ під час ембріонального розвитку [5].

Е-кадгерин — це ключова адгезивна молекула, що є кальційзалежним трансмембранним глікопротеїном і міститься в більшості епітеліальних клітин як ембріона, так і дорослого організму. Е-кадгерин діє як супресор розвитку ракових пухлин, створюючи молекулярний бар'єр для їхньої інвазії. Транскрипція гена Е-кадгерину в більшості пухлин відсутня, а відновлення його в клітинах карцином *in vitro* є достатнім фактором для зниження агресивності цих клітин [18].

Промотор Е-кадгерину структурно складається з неметильованих CpG-острівців та E-box [19, 23], які зумовлюють два типи його регуляції: епігенетичну та транскрипційну. E-box має сайти для впізнання транскрипційними факторами і містить послідовність 5'-CACCTG, що точно збігається з ДНК-зв'язуючим сайтом транскрипційного фактора Snail. Одним із головних механізмів при канцерогенезі є транскрипційна інактивація CpG-промотора гена Е-кадгерину за його аберантного гіперметилування.

Таким чином, Е-кадгерин відповідає за підтримання епітеліального фенотипу клітин. Катеніни- β , - α та - γ — молекули адгезивного комплексу, що поєднують білок Е-кадгерин з актиновими філаментами цитоскелета клітини (рис. 2) [19]. В епітеліальних шарах міжклітинні контакти формуються за участю молекул білка Е-кадгерину, що створює кластери і невеликі адгезивні комплекси, які сприяють формуванню десмосом [20]. За аберантного промоторного метилування гена

Е-кадгерину втрачається зв'язок із β -катеніном, який набуває властивостей транскрипційного фактора. Цей процес призводить до дезінтеграції адгезивного комплексу.

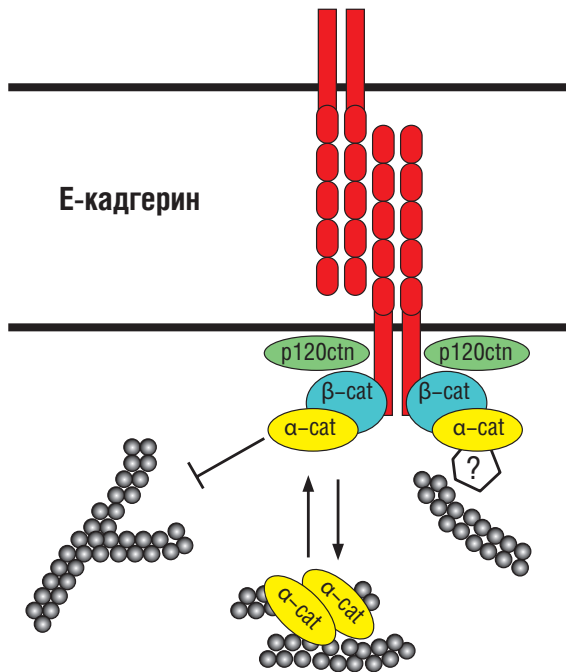


Рис. 2. Будова Е-кадгерин-бета-катенін адгезивного комплексу [19]

Показано, що ген *AKT*, описаний як ретровірусний онкоген із серин-треонінкіназною активністю [21], регулює Е-кадгерин на рівні мРНК та білка. На молекулярному рівні *AKT* активується в епітеліальних клітинах і має такі наслідки для гена Е-кадгерину, як пригнічення його транскрипції й акумуляція його залишку в перинуклеарних органелах [22]. При цьому мають місце два важливі типи зв'язуючих сайтів *E-box* промотору, що пригнічують експресію гена Е-кадгерину: *Ets* сайти і паліндромний *E-pal*. Цікаво, що діючи як репресор транскрипції гена Е-кадгерину, *Ets* фактори, серед яких є *AKT*, також беруть участь у регуляції ключових медіаторів інвазивності, таких як матрилізин, матриксна металопротеаза, колагеназа, гепариназа й урокіназа [23]. Остаточний доказ того, що ЕМТ ініціюється за допомогою гена *AKT*, надало дослідження, в якому гіперекспресія мутантної форми гена *AKT* у ракових клітинах викликала активацію ЕМТ і пригнічення експресії Е-кадгерину [24]. ЕМТ, активована за допомогою *AKT*, включає зниження клітинної адгезії, втрату клітинних контактів, морфологічні зміни, втрату апікобазальної поляризації клітин, активацію рухливості клітин, зміни в постачанні специфічних білків (продукція металопротеїназ). Наприклад, білок десмоплакін, що бере участь у формуванні десмосом, інтерналізується, а віментин (білок проміжних філаментів цитоскелета), наявний у більшості мезенхімальних клітин, активується. Таким чином, *AKT* білки (1–3), які беруть участь

у багатьох клітинних процесах, у тому числі регуляції клітинного циклу, клітинній проліферації, виживанні клітин, можуть бути й клітинними модуляторами ЕМТ через пригнічення Е-кадгерин-залежної адгезивності пухлинних клітин.

4. РЕГУЛЯЦІЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА Е-КАДГЕРИНУ ЗА РАХУНОК ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ

Із геном Е-кадгерину взаємодіють транскрипційні фактори двох типів: типу «петля-спіраль-петля», який включає *E12/E47*, *Twist1* (*Twist*), *Twist2* (*Dermo1*) [4], і типу «цинковий палець», у який входить родина *Snail* (*Snai1*, *Slug* або *Snai2*) [5] та родина *Zeb* (*Zeb1*, *Zeb2*, який також називають *SIP1*) [25]. Ці транскрипційні фактори зв'язують *E-boxes* всередині промотора гена Е-кадгерину і таким чином пригнічують транскрипцію цього гена. Саме наведені фактори є важливими в індукції ЕМТ і негативній регуляції гена Е-кадгерину. Вони запускають канонічний *Wnt*-бета-катенін сигнальний шлях, що є ключовим в активації ЕМТ.

4.1. Транскрипційний фактор *Snail* (*Snai1*)

Ключові транскрипційні фактори родини *Snail* (*Snai1*, *Slug*) є сильними репресорами транскрипції гена Е-кадгерину [5]. Лінії ракових клітин, в яких відсутня експресія Е-кадгерину, продукують велику кількість *Snail* білка, а трансфекція Е-кадгеринпозитивних ліній за участю *Snail* призводила до індукції ЕМТ та експресії мезенхімальних маркерів [26]. Окрім того, епітеліальні клітинні лінії, які експресують *Snail*, набувають фенотипу фібробластів з онкогенними та інвазивними властивостями. Таким чином, транскрипційний фактор *Snail* можна вважати вірогідним маркером злоякісного фенотипу [5].

Окрім Е-кадгерину, транскрипційний фактор *Snail* залучений до негативної регуляції інших епітеліальних маркерів, таких як десмоплакін, муцин *Muc-1* та цитокератин-18 (рис. 3). Віментин і фібронектин, маркери мезенхімальних клітин, також регулюються за допомогою *Snail*. Отже, транскрипційний фактор *Snail* має низку додаткових мішеней у регуляції ЕМТ [27]. Нещодавно описано ряд негативних регуляторів транскрипційного фактора *Snail*. Наприклад, активація *p53*, що зумовлена активацією *miRNA-34a/b/c* генів, пригнічує експресію *Snail*. У свою чергу, пригнічення *miRNA-34a/b/c* активує транскрипційний фактор *Snail* і сприяє процесу метастазування [28].

4.2. Транскрипційний фактор *Slug* (*Snai2*)

Slug — це транскрипційний фактор родини *Snail*, що залучений до ЕМТ і необхідний для міграції нервового гребеня з нервової трубки і ранньої мезодерми з первинної смужки ембріона курчати [29]. Роль транскрипційного фактора *Slug* в ЕМТ полягає у втраті клітинної адгезії та підвищенні рухливості епітеліальних клітин також. Однак показано, що експресія транскрипційного фактора *Slug*

при меланомі не пов'язана зі зниженням експресії E-кадгерину, канонічної Slug мішені в ЕМТ. Експресія екзогенного Slug у меланоцитах і клітинах меланоми *in vitro* пригнічує експресію E-кадгерину та посилює експресію N-кадгерину, зумовлюючи міграцію клітин. Рівень експресії транскрипційного фактора Slug найвищий на початку прогресування меланоми [6].

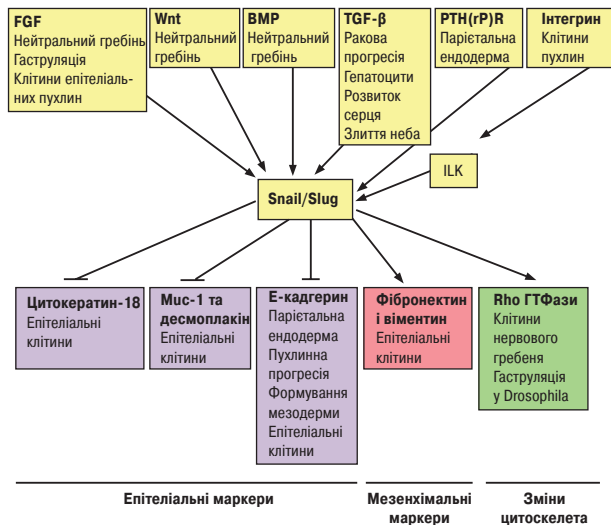


Рис. 3. Гени Snail охоплюють центральні позиції в індукції ЕМТ у фізіологічних і патологічних умовах [27]

4.3. Транскрипційний фактор Zeb1

Транскрипційний фактор Zeb1 бере участь в активації ЕМТ та гальмуванні процесів старіння [30]. В асоціації з транскрипційним фактором Twist, Zeb1/Twist мають дуалістичний вплив на ракову прогресію шляхом одночасного гальмування старіння, викликаного активацією онкогенів, та запуском ЕМТ.

4.4. Транскрипційний фактор Zeb2 (SIP1)

Транскрипційний фактор SIP1 — це інший *E-box*-зв'язуючий білок типу «цинковий палець», функціонує як сильний репресор гена E-кадгерину. Високий рівень експресії *SIP1* відзначають у клітинах, що мають аберантне гіперметилування E-кадгеринового гена [31]. Гіперекспресія *SIP1* знижує проліферативні можливості клітини шляхом пригнічення цикліну D3 [32]. Окрім того, SIP1 може модулювати TGF- β сигнальний шлях, який, як відомо, залучений до активації ЕМТ.

4.5. Транскрипційний фактор Twist1

Транскрипційний фактор Twist1 вперше був ідентифікований у *Drosophila* як один із генів, необхідних для формування мезодерми, тканинної диференціації та розвитку дорзо-вентральної осі в ранньому ембріогенезі [33]. Ген *Twist1* кодує транскрипційний фактор типу «петля-спіраль-петля» (bHLH) [34]. Експресія *Twist1* пов'язана з агресивністю різноманітних пухлин. Twist1 бере участь в ініціації, прогресії та метастазуванні ракових клітин [35]. *Twist1* може активуватися при викликаному онкогенами старінні й апоптозі [36], підвищеній резистентності ракових клітин до хіміотерапії [13].

Цікаво, що як Twist1, так і Twist2 пригнічують індуквану онкогенами і p53-залежну клітинну смерть. Ген *Twist1* діє на p53 опосередковано через пригнічення експресії *ARF* у модульованні ARF/MDM2/p53 сигнального шляху [36]. Таким чином, Twist1, Twist2 активують ЕМТ і агресивну клітинну міграцію в епітеліальних клітинах. Передбачається, що білок Twist може допомагати раковим клітинам уникати захисних програм організму. Показано, що індукція ЕМТ шляхом експресії *Twist1* і *Snail* в епітеліальних клітинах веде до зростання популяції стовбурових клітин із високим рівнем експресії CD44 і низьким рівнем експресії CD24, у той час як ізольовані епітеліально-стовбуровоподібні клітини експресують ендogenous ЕМТ-асоційовані фактори, включаючи Twist1, Snail, SIP1, Slug та FOXC2 [37].

Нещодавні дослідження показали вірогідний молекулярний механізм, в якому транскрипційний фактор Twist1 пригнічує експресію гена E-кадгерину і сприяє міграції ракових клітин, інвазії та метастазуванню [34]. Автори охарактеризували Twist1-асоційований білковий комплекс, продемонструвавши, що Twist1 опосередковано або безпосередньо взаємодіє з компонентами Mi2/нуклеосомного і дезацетилазного (Mi2/NuRD) білкових комплексів, включаючи MTA2, Rb-асоційований білок 46 (RbAp46), Mi2 і гістондезацетилазу 2 (HDAC2). Twist1 опосередковує приєднання цих білкових комплексів до промотора гена E-кадгерину і таким чином пригнічує його активність та експресію через хроматинзалежні механізми.

5. СИГНАЛЬНІ ШЛЯХИ, ЩО БЕРУТЬ УЧАСТЬ В ЕМТ

Основною відмінністю між нормальним розвитком і патологічним процесом є те, що молекулярні події є строго врегульованими у часі та просторі впродовж розвитку та диференціації клітини, в той час як при канцерогенезі ці події набувають стохастичного характеру. Однак феномен ЕМТ та сигнальні шляхи, активація яких супроводжує його індукцію, стають пріоритетними в механізмі злоякісної трансформації.

Ключові онкогенні сигнальні шляхи, в яких задіяні, зокрема, Sarc, Ras, α -, β -інтегрин, TGF- β , Wnt/ β -катенін та Notch викликають направлену індукцію ЕМТ та зниження регуляції клітинної адгезії, зокрема експресії E-кадгерину. Окрім того, нещодавно показано, що активація фосфатидилінозитол-3'-кіназного шляху PI3K/AKT є також центральною ознакою ЕМТ [2]. Подібна масивна активація сигнальних шляхів, що конститутивно пов'язується з масивною активацією відповідних транскрипційних факторів в індукції ЕМТ та пригніченні експресії E-кадгерину (Snail, Slug, Twist 1,2, Zeb 1,2 та ін.), набуває особливого значення біомаркерів у феномені ЕМТ [24].

5.1. TGF- β сигнальний шлях і деякі способи його активації

TGF- β активує EMT, внаслідок чого епітеліальні клітини втрачають адгезію і полярність та набувають мезенхімального фенотипу, що супроводжує резистентність ракових клітин [38]. Трансформуючий фактор росту бета (TGF- β) має дуалістичну роль у прогресуванні раку молочної залози. TGF- β діє як супресор і активатор пухлин [39, 40]. У нормі він експресується в клітинах молочної залози. Експресія гена *TGF- β* зростає під час вагітності [41]. Резистентність ракових клітин зумовлюється TGF- β -опосередкованим блокуванням клітинного циклу й апоптозом [40]. TGF- β сигналінг бере участь у пригніченні клітинної проліферації, однак цей фактор може сприяти прогресуванню пухлини, якщо клітини набувають резистентності до пригнічувального ефекту TGF- β [42]. *In vivo* Ras-трансформовані клітини поступово набувають фенотипу фібробластів, що корелює з переходом від паракринної до аутокринної активації TGF- β сигнального шляху [43]. MAPK сигналінг, активований завдяки онкобілку Ras, має важливе значення для EMT і метастазування, в той час як PI3K, інший ефектор Ras, у першу чергу індукує пригнічення апоптозу шляхом активації TGF- β сигналіngu [44]. Стабільна активація *Raf* в культурі епітеліальних клітин нирки MDCK (Madin — Darby canine kidney cells) спричиняє EMT за рахунок аутокринної експресії TGF- β [42]. *In vivo* на моделі раку шкіри показали двозначну роль для TGF- β : він пригнічує проліферацію на ранній гіперпластичній стадії та виявляє енансерну функцію в прогресії інвазивності карциноми [45].

Після EMT мезенхімальні клітини набувають ознак TISC (tumor initiating stem-like cells) — ознак неопластичного фенотипу за механізмом самовідновлення, важливого для підтримання пухлинної прогресії. Індукція EMT за рахунок TGF- β пов'язується з набуттям цих характеристик та активацією транскрипційних факторів *Snail1* і *Nanog* при раку молочної залози [3, 46]. Слід зазначити, що експресія як *Snail1*, так і *Nanog* вища в мезенхімальних клітинах. У клітинах мезенхіми інгібування *Snail1* веде до втрати *Nanog* і скорочення кількості TISC характеристик. Із редуцією *Snail1* у мезенхімальних-*Snail1*-shRNA клітинах зниження регуляції *Snail1* корелює зі зниженням експресії *Nanog* і *CD44* [3]. Пригнічення лише *Snail1* не є достатнім фактором інгібування ініціації канцерогенезу, але дійсно призводить до зниження швидкості росту пухлини *in vivo* [46].

Активація специфічної транскрипції генів за рахунок β -катеніну також координується TGF- β сигналігом (рис. 4). Гени активуються по-різному: або лише за рахунок Wnt сигналіngu, або у комплексі з TGF- β . Найвищий рівень транскрипції генів спостерігається тоді, коли вони активуються за рахунок Smads, TCF/LEF і β -катеніну [47].

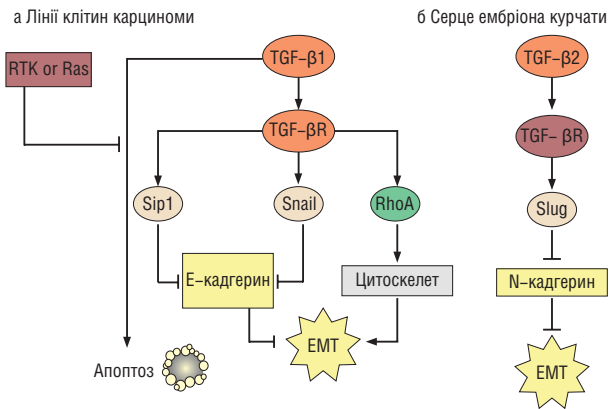


Рис. 4. Двозначна роль TGF- β у появі й прогресії карциноми [48]

5.2. Wnt сигнальний шлях

Wnt сигналінг — це один із потужних сигнальних шляхів контролю генетичних програм ембріонального розвитку та гомеостазу стовбурових клітин в онтогенезі. Канонічний Wnt сигналінг відіграє важливу роль у підтриманні різноманітних ембріональних стовбурових клітин, що також характерно стосовно фенотипу канцерасоційованих стовбурових клітин. При дерегуляції такий сигнальний шлях викликає серйозні дефекти розвитку та патології, серед яких онкопатології, тому, за сучасними даними, Wnt сигналінг набуває ключового значення в таргетній медицині ракових стовбурових клітин [49].

Сигнал ініціюється шляхом Wnt лігандів; 19 Wnt лігандів у геномі людини [50]. Секреція і посттрансляційна модифікація Wnt лігандів досягається за рахунок мультимерного комплексу і суміжних молекул, таких як Wntless (Wnts) [51].

Wnts зв'язують та активують специфічні рецептори членів родин Frizzled та LRP. Інгібітори Wnt-рецепторів при взаємодії секретують Frizzled-споріднені білки (sFRP), Dickkopfs (Dkk), Wnt інгібуючий фактор (WIF1), що мають відношення до природньої down-регуляції Wnt сигнального шляху [52]. Wnt сигналінг починається на плазматичній мембрані шляхом зв'язування Wnt ліганду з Fz рецептором і LRP. Цей сигнал передається в цитоплазму через Dsh/Dvl і призводить до пригнічення комплексу бета-катенін/Axin/APC/GSK3 β та протеасомної деградації бета-катеніну [53].

5.3. Канонічний Wnt/ β -катеніновий сигналінг

Центральною функцією канонічного Wnt сигналіngu є контроль стабільності β -катеніну [53]. Останній має подвійну функцію (адгезивної молекули та сигнальну як транскрипційного фактора) та може формувати стабільні комплекси з клітинними адгезивними молекулами, такими як E-кадгерин, γ - та α -катеніни і, таким чином, бути медіатором між трансмембранним E-кадгерином та цитоскелетом [54]. За відсутності Wnt сигналу β -катенін, який не зв'язався в комплекс із кадгеринами, захоплюється мультикомплексом про-

теасомної деградації, що містить GSK3 β , Axin/Conductin, APC, і шляхом його послідовного фосфорилування та убіквітинуювання N-термінальної послідовності стає мішенню протеасомної деградації [55]. За відсутності Wnt ліганду, β -катенін фосфорилується за рахунок комплексу, що включає скефолд-білки Axin, APC і Gsk3 β . Фосфорильований β -катенін впізнається E3-убіквітин лігазою β -TrCP і є об'єктом протеасомної деградації. На противагу цьому, за наявності Wnt лігандів комплекс протеасомної деградації руйнується шляхом фосфорилування LRP5/6 і зв'язує Axin із LRP, що запобігає деградації β -катеніну [56]. Вільний β -катенін, набуваючи функції транскрипційного ко-фактора, делокалізується в ядро, зв'язуючись із Tcf/Lef родинною транскрипційних факторів, заміщаючи природний транскрипційний інгібітор Groucho в подальшій цільовій активації Wnt/бета-катенін сигналіну та його таргетних генів (*Ras*, *c-myc*, *Okt4*, *циклін-D* та ін.), що сприяють підтриманню фенотипу канцероасоційованих стовбурових клітин [57].

Таким чином, набуті мутації, що активують Wnt сигналінг, можуть мати онкогенну активність, у той час як мутації, пов'язані з пригніченням Wnt сигналіну, ведуть до супресорної активності в канцерогенезі. Для прикладу: мутації в генах, що контролюють стабільність β -катеніну, такі як APC, гени аксину та E-кадгерину, спричиняють розвиток різноманітних типів раку через онкогенну активацію β -катеніну та Wnt- β -катенінового сигналіну [58, 59].

Tcf/Lef1 є ключовими транскрипційними факторами, що регулюють експресію генів після активації Wnt сигналіну в канцерогенезі, а саме онкогенів *Ras*, *c-myc*, *Okt4* та *циклін-D* у ядрі, з якими безпосередньо асоціюється фенотип ракових стовбурових клітин. Таким чином, онкогенна функція β -катеніну як ко-фактора зводиться до активації генів *Tcf/Lef1* транскрипційних факторів у β -катенін-Wnt сигнальному шляху. Транскрипційні фактори EMT, такі як Snail, Slug, спричиняють онкогенну активацію β -катеніну [60]. З іншого боку, не відзначали зміни регуляції *Snail* і *Slug* після гіперекспресії *Lef* в епітеліальних клітинах, що також поєднує Snail і Slug лише з транскрипційною активацією β -катеніну [61]. Однак цікавий взаємозв'язок виникає між TGF- β і Wnt сигнальними шляхами через роль *Snail* у пригніченні експресії E-кадгерину [62]. Активація канонічного Wnt сигнального шляху зумовлюється накопиченням β -катеніну за порушення його протеасомної деградації в цитоплазмі при канцерогенезі, тирозинкіназною активацією [63] для специфічного зв'язування з TCF/LEF транскрипційними факторами в транслокалізації до ядра та регуляцією експресії таргетних генів Wnt сигнального шляху [64]. З іншого боку, високий рівень E-кадгерину орієнтує β -катенін на формування адгезивних

комплексів на мембрані клітини [54]. Таким чином, TGF- β сигналізація сприяє опосередкованій активації β -катенін-Wnt сигнального шляху специфічним впливом на зниження рівня експресії гена E-кадгерину через підтримання експресії фактора Snail (рис. 4) [24]. Це пояснює, чому у TGF- β -мутантних мишах, що мають ослаблену Wnt сигналізацію, порушується функціонування E-кадгерину [65].

5.4. Ініціація Wnt/ β -катенін сигнального шляху

Ініціація Wnt/ β -катенінового сигнального шляху відбувається на цитоплазматичній мембрані. Зв'язування секреторного білка Wnt1 з комплексом Fz/LRP призводить до фосфорилування LRP 6 за допомогою кінази Gsk3 β і казеїнової кінази CkI γ , які, ймовірно, необхідні для приєднання Axin до фосфорильованих залишків LRP 6. Показано, що фосфорильовані ліганди LRP 6, Dvl, Fz, Axin і Gsk3 β ко-локалізуються в сигналосомах [66]. Fz, Dvl і Axin є необхідними сигнальними молекулами для LRP 6 фосфорилування за допомогою Gsk3 β [67]. За відсутності секреторної активації Wnt сигналіну фосфорильований β -катенін є мішенню протеасомної деградації за рахунок комплексу, що містить Axin, APC, Gsk3 β . У цілому, це забезпечує підтримку моделі, в якій секреторний білок Wnt1 зв'язується з Fz(Frizzled)-білками, а Gsk3 β може фосфорилувати приєднані до LRP 6 залишки Axin, що зумовлює зв'язування зі скефолд-білками та інактивацію комплексу протеасомної деградації β -катеніну (рис. 5). Така модель підтверджує гіпотезу поетапного складання молекулярних компонентів Wnt сигнального шляху [68].

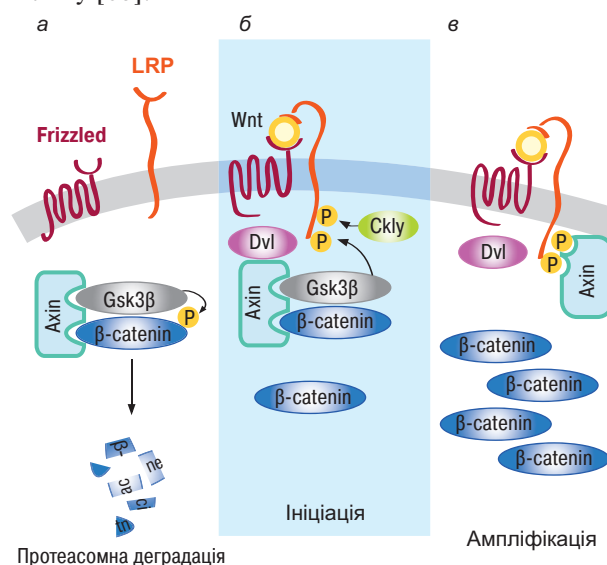


Рис. 5. Модель активації Wnt/ β -катенін сигнального шляху [67]

Показано, що клітини, які накопичують β -катенін у ядрі, можуть являти собою мігруючі стовбурові клітини та гетерогенно розподілятися як у первинній пухлині, так і в метастазах [69].

Axin2 швидко деградує після мітозу в таких клітинах; припускають, що це впливає на регуляцію β -катенінового сигналіну і стимулює нову фазу мітотичного циклу [67].

Активація тирозинкіназ може стимулювати β -катеніновий сигналінг у ядрі [2]. Структурна і функціональна цілісність кадгерин-катенінового комплексу регулюється шляхом фосфорилування. Серин-треонінкіназне фосфорилування β -катеніну відповідно Gsk3 β і CkI γ кіназами призводить до зростання стійкості E-кадгерин- β -катенінового комплексу. Однак тирозинкіназне фосфорилування β -катеніну за рахунок цитоплазматичної кінази (Fes) перешкоджає зв'язуванню β -катеніну з α -катеніном [70], у той час як фосфорилування β -катеніну за рахунок Src або епідермального фактора росту (EGF) перешкоджає зв'язуванню β -катеніну з E-кадгеріном. Таким чином, активація саме тирозинкіназами асоціюється із втратою E-кадгерин- β -катенін-опосередкованої міжклітинної адгезії та підвищенням рівня вільного цитоплазматичного β -катеніну з подальшою транслокалізацією до ядра та набуттям онкогенної функції [71].

ВИСНОВКИ

Прогресування раку — це остання фаза розвитку пухлини шляхом малігнізації, в якій остаточну роль відіграють стадії інвазії та метастазування пухлинних клітин. Роль стовбурових клітин в інвазивно-метастазуючому каскаді пухлини не викликає сумніву. Зрозуміти механізми індукції циркулюючих пухлиноасоційованих стовбурових клітин в інвазивно-метастазуючому фенотипі означає знайти біологічні шляхи подолання прогресування раку та протипухлинної клітинної терапії, мішенями якої стають не так власне стовбурові клітини, як клітинні молекулярні механізми, що супроводжують їх індукцію. Концепція авторів полягає в тому, що феномен ЕМТ у мікрооточенні пухлини є ключовою програмою до інвазивно-метастазуючого фенотипу ракових клітин, і тому цілком вірогідно його можна вважати специфічним логотипом ракової прогресії. Механізм ЕМТ у канцерогенезі включає в себе два феномена: морфологічний і сигнальний. Перший пов'язується з морфологічною трансформацією епітеліальних клітин у мезенхімальні, що відбувається при зниженні експресії епітеліальних маркерів (E-кадгерин, цитокератин, десмоплакін та ін.) та індукції мезенхімальних маркерів (Snail, Slug, Twist, N-кадгерин та ін.). Другий феномен ЕМТ полягає в дозріванні мезенхімальних клітин до пухлиноасоційованих стовбурових клітин, що супроводжується активацією ряду сигнальних шляхів стовбурових клітин (Wnt/ β -катенін, TGF- β , Notch та ін.). Порушення контрольованого балансу епітеліальних клітин у мікрооточенні пухлини та, як наслідок, індукція ЕМТ в ініціації інвазивно-метастазуючого потен-

ціалу ракових клітин можуть бути мішенню клітинної регуляції в протипухлинній терапії. Наприклад, втрата експресії E-кадгерину — ключової молекули міжклітинного адгезивного сигналіну — та «переключення» на β -катенін-Wnt сигналінг розглядається як фундаментальна подія в феномені ЕМТ при пухлинній прогресії. Таким чином, із втратою адгезивності пухлинних клітин вірогідно ототожнюється індукція інвазивно-метастазуючого потенціалу ракових клітин, що може відкривати шлях до регуляції цих процесів, зокрема епігенетичної, в протипухлинній терапії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; **119**: 1420–1428.
2. Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* 2005; **24**: 7443–54.
3. Thiery J, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; **139**: 871–90.
4. Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004; **117**: 927–39.
5. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, et al. The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000; **2**: 76–83.
6. Shirley SH, Greene VR, Duncan LM, et al. Slug expression during melanoma progression. *Am J Pathol* 2012; **180**: 2479–89.
7. Qin Q, Xu Y, He T, et al. Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms. *Cell Res* 2012; **22**: 90–106.
8. Tamura G, Yin J, Wang S, et al. E-cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**: 569–73.
9. Melki JR, Vincent PC, Brown RD, et al. Hypermethylation of E-cadherin in leukemia. *Blood* 2000; **95**: 3208–13.
10. Yook JI. Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor Snail. *J Biol Chem* 2005; **280**: 11740–8.
11. Reya T, Morrison SJ. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; **414**: 105–11.
12. Bielas JH, Loeb KR, Rubin BP, et al. Human cancers express a mutator phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 18238–42.
13. Li R, Sonik A, Stindl R, et al. Aneuploidy vs. gene mutation hypothesis of cancer: recent study claims mutation but is found to support aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **7**: 3236–41.
14. Martin-Belmonte F, Perez-Moreno M. Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer* 2011; **12**: 23–38.
15. Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein L. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; **12**: 126–131.
16. Lim J, Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development* 2012; **139**: 3471–86.
17. Huber O, Bierkamp C, Kemler R. Cadherins and catenins in development. *Curr Opin Cell Biol* 1996; **8**: 685–91.
18. Rodrigo I, Cato AC, Cano A. Regulation of E-cadherin gene expression during tumor progression: the role of a new Ets-binding site and the E-pal element. *Exp Cell Res* 1999; **248**: 358–71.
19. Niessen CM, Gumbiner BM. Cadherin-mediated cell sorting not determined by binding or adhesion specificity. *J Cell Biol* 2002; **156**: 389–399.

20. **Kowalczyk AP, Bornslaeger EA, Norvell SM, et al.** Desmosomes: intercellular adhesive junctions specialized for attachment of intermediate filaments. *Int Rev Cytol* 1999; **185**: 237–302.
21. **Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, et al.** A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 1991; **254**: 274–7.
22. **Testa JR, Bellacosa A.** AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 10983–5.
23. **Giroldi LA, Bringuier PP, de Weijert M, et al.** Role of E-boxes in the repression of E-cadherin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **241**: 453–458.
24. **Grille SJ, Bellacosa A, Upton J, et al.** The protein kinase Akt induces EMT and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res* 2003; **63**: 2172–8.
25. **Comijn J, Berx G, Vermassen P, et al.** The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 2001; **7**: 1267–78.
26. **Battle E, Sancho E, Franci C, et al.** The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature Cell Biol* 2000; **2**: 84–9.
27. **Nieto MA.** The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**: 155–66.
28. **Siemens H, Jackstadt R, Hünten S.** miR-34 and Snail form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions. *Cell Cycle* 2011; **10**: 4256–71.
29. **Nieto MA, Sargent MG, Wilkinson DG.** Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science* 1994; **264**: 835–9.
30. **Smit MA, Peeper DS.** Epithelial-mesenchymal transition and senescence: two cancer — related processes are crossing paths. *AGING* 2010; **2**: 735–741.
31. **Comijn J, Berx G, Vermassen P, et al.** The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 2001; **7**: 1267–78.
32. **Mejlvang J, Krijevska M, Vandewalle C, et al.** Direct repression of cyclin D1 by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an EMT. *Mol Biol Cell* 2007; **18**: 4615–4624.
33. **Castanon I, Von Stetina S, Kass J, et al.** Dimerization partners determine the activity of the Twist bHLH protein during *Drosophila* mesoderm development. *Development* 2001; **128**: 3145–59.
34. **Fu J, Qin L, He T, et al.** The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis. *Cell Res* 2011; **21**: 275–289.
35. **Puisieux A, Valsesia-Wittmann S, Ansieau S.** A twist for survival and cancer progression. *Br J Cancer* 2006; **94**: 13–17.
36. **Maestro R, Dei Tos AP, Hamamori Y, et al.** Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev* 1999; **13**: 2207–17.
37. **Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al.** The EMT generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; **133**: 704–15.
38. **Xu J, Lamouille S, Derynck R.** TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 2009; **19**: 156–72.
39. **Padula D.** Roles of TGF-beta in metastasis. *Cell Res* 2009; **19**: 89–102.
40. **Bierie B.** TGF-beta promotes cell death and suppresses lactation. *J Cell Physiol* 2009; **219**: 57–68.
41. **Faure E, Heisterkamp N, Groffen J, et al.** Differential expression of TGF-beta isoforms during postlactational mammary gland involution. *Cell Tissue Res* 2000; **300**: 89–95.
42. **Lehmann K, Janda E, Pierreux CE, et al.** Raf induces TGF-beta production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells. *Genes Dev* 2000; **14**: 2610–2622.
43. **Oft M, Peli J, Rudaz C, et al.** TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev* 1996; **10**: 2462–77.
44. **Janda E, Lehmann K, Killisch I, et al.** Ras and TGF-beta cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol* 2002; **156**: 299–313.
45. **Cui W, Fowles DJ, Brysonet S, et al.** TGF-beta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell* 1996; **86**: 531–42.
46. **Dang H, Ding W, Emerson D, et al.** Snail1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and tumor initiating stem cell characteristics. *BMC Cancer* 2011; **11**: 1–13.
47. **Labbé E, Letamendia A, Attisano L.** Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor-beta and wnt pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 8358–63.
48. **Thiery J.** Epithelial-mesenchymal transition in tumor progression. *Nature Rev Cancer* 2002; **2**: 442–454.
49. **MacDonald BT, Tamai K, He X.** Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009; **17**: 9–26.
50. **Tan RZ, Ji N, Mentink RA, et al.** Deconvolving the roles of Wnt ligands and receptors in sensing and amplification. *Mol Syst Biol* 2013; **9**: 1–13.
51. **Das S, Yu S, Sakamori R, et al.** Wntless in Wnt secretion: molecular, cellular and genetic aspects. *Front Biol (Beijing)* 2012; **7**: 587–593.
52. **Voronkov A, Krauss S.** Wnt/beta-catenin signaling and small molecule inhibitors. *Curr Pharm Des* 2013; **19**: 634–64.
53. **Clevers H.** Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006; **149**: 1192–20.
54. **Valenta T, Hausmann G, Basler K.** The many faces and functions of beta-catenin. *EMBO J* 2012; **31**: 2714–36.
55. **Behrens J, Jerchow BA, Würtele M.** Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 1998; **280**: 596–9.
56. **Schwarz-Romond T, Metcalfe C, Bienz M.** Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies. *J Cell Sci* 2007; **120**: 2402–12.
57. **Wang C, Lisanti MP, Liao DJ.** Reviewing once more the c-myc and Ras collaboration: converging at the cyclin D1-CDK4 complex and challenging basic concepts of cancer biology. *Cell Cycle* 2011; **10**: 57–67.
58. **Polakis P.** Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000; **14**: 1837–51.
59. **Grigoryan T, Wend P, Klaus A, et al.** Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev* 2008; **22**: 2308–2341.
60. **Savagner P.** Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* 2001; **23**: 912–23.
61. **Kim K, Lu Z, Hay ED.** Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol Int* 2002; **26**: 463–76.
62. **Zavadil J, Böttlinger EP.** TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005; **24**: 5764–74.
63. **Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ.** Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001; **344**: 1031–37.
64. **Willert, K, Nusse R.** beta-catenin: a key mediator of Wnt signalling. *Curr Opin Genet Dev* 1998; **8**: 95–102.
65. **Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C.** Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF-beta-mediated fibrosis. *Nat Commun* 2012; **3**: 1–13.
66. **Bilic J, Huang Y, Davidson G, et al.** Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* 2007; **316**: 1619–1622.
67. **Fuerer C, Nusse R, Berge D.** Wnt signalling in development and disease. *EMBO Rep* 2008; **9**: 134–138.

68. **Baig-Lewis S, Peterson-Nedry W, Wehrli M.** Wingless/Wnt signal transduction requires distinct initiation and amplification steps that both depend on Arrow/LRP. *Dev Biol* 2007; **306**: 94–111.

69. **Cai J, Guan H, Fang L, et al.** MicroRNA-374a activates Wnt/ β -catenin signaling to promote breast cancer metastasis. *J Clin Invest* 2013; **123**: 566–79.

70. **Piedra J, Miravet S, Castaño J, et al.** p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin interaction. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 2287–97.

71. **Roura S, Miravet S, Piedra J, et al.** Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1999; **274**: 36734–40.

EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION IN CARCINOGENESIS

L.P. Shvachko, O.V. Kholod

Summary. *Transient non-oncogenic EMT is a normal cellular program that initiates cell migration during embryogenesis to direct organ development. In differentiated tissues EMT directs wound healing, regeneration and remodelling. EMT — the epithelial-to-mesenchymal transition is the basis platform of the tumor microenvironment. EMT causatively binding with the tumor progres-*

sion, by which are modulated the migrational, invasive and metastatic potentials of the tumor cells. Therefore, EMT is the crucial microenvironment metastatic niche for the final cancer cell aggressiveness. Moreover, EMT underlies cancer stem cell induction and also controls tumor drug sensitivity modulating the response of cancer cells to chemotherapy. The earlier event of EMT metastatic cascade is the epigenetic deregulation of the E-cadherin-beta-catenin adhesive signaling. The epigenetic regulation of EMT might be considered as the target for a new cancer epigenetic therapy strategies.

Key Words: epithelial-mesenchymal transition (EMT), cancerogenesis, metastasis, E-cadherin-beta-catenin, Wnt-beta-catenin.

Адреса для листування:

Швачко Л.П.

03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150
Інститут молекулярної біології і генетики НАН
України

E-mail: l.p.shvachko@imbg.org.ua

Одержано: 10.10.2013