

УДК 616.594.1-006-02

DOI 10.18286/1816-4501-2019-1-57-61

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ BMP В РАЗВИТИИ ОПУХОЛЕЙ КОЖИ

Мардарьев Андрей Николаевич, доктор биологии и медицины, заведующий лабораторией Центра проблем кожи Бредфордского медицинского университета¹.

e-mail: a.mardaryev@bradford.ac.uk

Мардарьева Наталия Валерьевна, кандидат биологических наук, доцент, зав. кафедрой биотехнологий и переработки сельскохозяйственной продукции².

e-mail: volga480@yandex.ru

Ларионов Геннадий Анатольевич, доктор биологических наук, профессор кафедры биотехнологий и переработки сельскохозяйственной продукции².

e-mail: larionovga@mail.ru

¹Бредфордский университет, Великобритания, Ричмод Роад, Бредфорд, BD7 1DP

²ФГБОУ ВО Чувашская ГСХА, 428003, г. Чебоксары, ул. Карла Маркса, д. 29; тел.: 89278411221

Ключевые слова: кожа, костные морфогенетические белки, ноггин.

В статье приведены результаты изучения роли и выявления молекулярных механизмов вовлечения BMP сигнального пути в развитии опухолей кожи с использованием в качестве модели трансгенных мышей, оверэкспрессирующих BMP антагонист ноггин под контролем промотора гена кератина 14 (K14-Noggin). Для изучения роли BMP в развитии опухолей кожи была создана трансгенная (TG) линия мышей, оверэкспрессирующая BMP антагонист ноггин под контролем промотора гена кератина 14. Для проведения исследования нами были взяты образцы кожи у мышей в следующие сроки: 0, 4, 10, 14, 20, 24, 28, 32, 36, 40 дни постнатального онтогенеза (P0 - P40 соответственно), а также на сроках 12-24 недель. Для каждого срока было выбрано по 5-7 мышей опытной и контрольной линии. После взятия образцы кожи немедленно замораживались в жидком азоте и заключались в заливочную среду (Tissue-Tek, O.C.T. 4583 Compound, Sakura, USA) с последующим хранением при температуре -80°C. Эксперименты на животных были проведены по протоколам, одобренным Университетом Бредфорда (лицензия PPL 40/2989) и Чувашской государственной сельскохозяйственной академией. Полученные данные свидетельствуют, что ингибирование BMP сигнального пути приводит к формированию эпителиальных опухолей кожи. Поддержание активности BMP сигнального пути в коже является одним из факторов, предотвращающих трансформацию эпителиальных клеток в опухолевые. Таким образом, трансгенная экспрессия ноггина действительно приводит к ингибированию канонического BMP сигнального пути в эпидермальных и волосяных кератиноцитах.

Введение

Кожа является одним из самых крупных органов млекопитающих и обеспечивает ряд важных функций, необходимых для выживания. Кожа защищает организм от потери воды, изменения температуры, радиации, травм и инфекций. Кожа также позволяет организму воспринимать окружающую среду через тактильные чувства и служит важным компонентом в социальном и репродуктивном поведении [1]. Для выполнения такого разнообразия функций кожа

демонстрирует структурную сложность в организации. Важную роль в контроле и в поддержании клеточной идентичности при их дифференцировке в специализированные типы клеток играет группа поликомбных белков, функционирующие как транскрипционные репрессоры [2, 3, 4]. Кожа человека, как и других млекопитающих, представлена элементами эктодермального и мезодермального происхождения, которые постоянно взаимодействуют между собой путем многочисленных индуктивных и ингибирующих

сигналов, объединяющих все составные элементы кожи в единый функционирующий орган [5]. Эпидермис и его придатки (волосяные фолликулы, сальные железы, потовые железы) представляют собой эктодермальное производное кожи, в то время, как дерма и подкожная жировая ткань имеют мезодермальное происхождение [6].

Костные морфогенетические белки (Bone Morphogenetic Proteins, BMP) представляют собой класс протеинов, принадлежащих суперсемейству трансформирующих факторов роста (TGF-beta). BMP белки являются многофункциональными регуляторами развития, контролирующими процессы клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза во многих органах, в том числе и в коже [7, 8].

Примерно 90% опухолей, развивающихся во взрослом организме, имеют эпителиальную природу. Постоянное и нередко повреждающее воздействие факторов окружающей среды обуславливает значительную быстроту обновления эпителия. Элиминация поврежденных клеток таких эпителиальных структур, как эпидермис кожи и эпителий желудочно-кишечного тракта, обладающих значительной пролиферативной активностью, является защитной реакцией. При этом процессы самообновления требуют точной координации всех звеньев механизма регуляции роста [9,10].

Объекты и методы исследований

Целью настоящей работы является изучение роли и выявление молекулярных механизмов вовлечения BMP сигнального пути в развитии опухолей кожи с использованием в качестве модели трансгенных мышей, сверхэкспрессирующих BMP антагонист ноггин под контролем промотера гена кератина 14 (K14-Noggin). Для достижения поставленной цели одной из важных задач является проведение фенотипического анализа кожи K14-Noggin трансгенных мышей и характеристика основных этапов развития спонтанных опухолей кожи.

Трансгенная линия мышей с гиперэкспрессией BMP антагониста ноггина была произведена Университетом Брэдфорда путем клонирования к ДНК мышиноного ноггина в генетическую конструкцию под контролем промотера Кератина 14 (K14) [11]. Трансгенные мыши были получены на основе FVB/NJ инбредных мышей, обладающих повышенной чувствительностью к химическому канцерогенезу по сравнению с другими линиями [12]. В качестве контроля были использованы мыши линии FVB/ NJ от компании Charles River. Мыши находились в общих клетках с 12 часовым свето-

вым периодом и со свободным доступом к воде и пище.

Для изучения роли сверхэкспрессии ноггина в развитии опухолей образцы кожи были взяты у мышей в следующие сроки: 0, 4, 10, 14, 20, 24, 28, 32, 36, 40 дни постнатального онтогенеза (P0 - P40 соответственно), а также на сроках 12-24 недель. Для каждого срока было выбрано по 5-7 мышей опытной и контрольной линий. После взятия образцы кожи немедленно замораживались в жидком азоте и заключались в заливочную среду (Tissue-Tek, O.C.T. 4583 Compound, Sakura, USA) с последующим хранением при температуре -80°C.

Эксперименты на животных были проведены по протоколам, одобренным Университетом Брэдфорда (лицензия PPL 40/2989) и Чувашской государственной сельскохозяйственной академией.

Результаты исследований

Генетическая конструкция (рис. 1А), примененная для создания K14-Noggin мышей, предполагает экспрессию трансгена ноггина в базальном слое межфолликулярного эпидермиса, наружном корневом влагалище волосяного фолликула и сальных желез (т.е. в местах экспрессии кератина 14) [13]. Вестерн блот-анализ суммарных белков кожи с использованием антител к эпитоноггину подтвердил значительное увеличение синтеза протеина ноггина в коже TG мышей (рис. 1В). Экспрессия трансгена также подтверждена с помощью гибридизации *in situ* с использованием рибонуклеотидной пробы к поли-А концу человеческого гормона роста, входящего в состав генетической конструкции, использованной для создания данной трансгенной линии мышей (рис. 1D). Для подтверждения специфичности данная проба также была использована на срезах кожи от контрольных мышей (WT), у которых не было выявлено специфического сигнала после гибридизации с трансгенной пробой (рис. 1С).

В качестве критерия оценки влияния трансгенного ноггина на активность BMP сигнального пути в эпидермисе и волосяном фолликуле было проведено определение уровня экспрессии активированных форм Smad белков, участвующих в трансмиссии BMP сигнала в клетке.

Иммунофлюоресцентное исследование кожи с использованием антител к фосфо-Smad1/5/8 (pSmad1/5/8) выявило значительное снижение экспрессии pSmad1/5/8 в волосяных фолликулах TG мышей по сравнению с животными дикого типа (рис. 1G, 1H). В межфолликулярном эпидермисе контрольных мышей экспрессия pSmad1/5/8 была выявлена в диф-

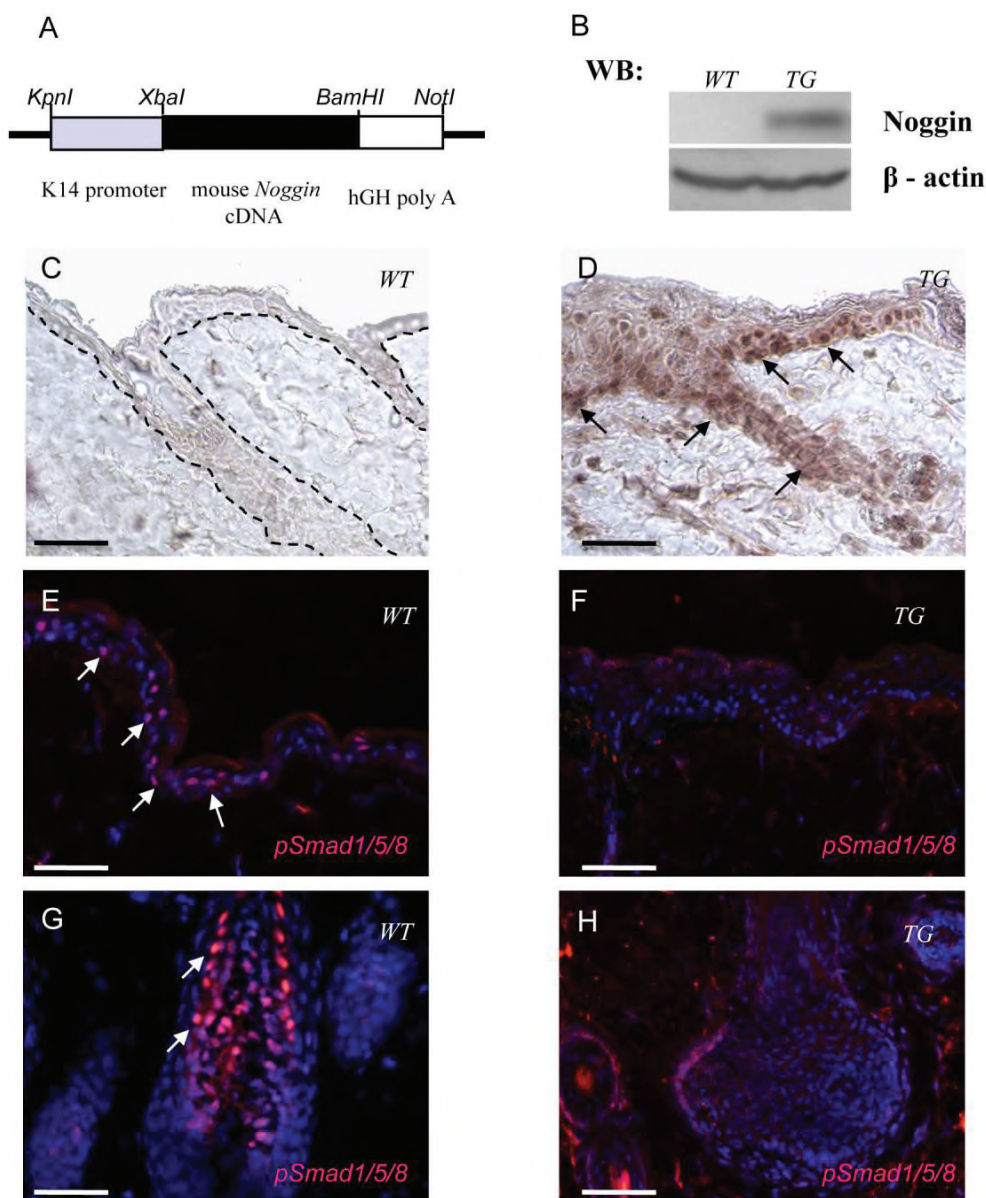


Рис. 1 - Экспрессия K14-Noggin конструкции и pSmad1/5/8 в коже контрольных и трансгенных мышей

(A) Трансгенная конструкция состоит из промотора человеческого K14, кДНК мышинового ноггина и поли-А последовательности человеческого гормона роста; (B) Выявление экспрессии белка ноггина в коже WT и TG мышей с помощью Вестерн-блоттинга; (C, D) Экспрессия трансгенной мРНК ноггина в коже WT (C) и TG (D) (стрелками указаны ноггин-экспрессирующие клетки; пунктирная линия отделяет эпидермис и волосяной фолликул от дермы); (E-H) Экспрессия pSmad 1/5/8 в коже WT (E,G) и TG (F,H) мышей (стрелки указывают на pSmad1/5/8-позитивные клетки). Шкала - 50 мкм.

ференцирующихся кератиноцитах супрабазального слоя, тогда как у TG мышей экспрессия активированных форм Smad белков практически не определялась (рис.1E, 1F). Таким образом, трансгенная экспрессия ноггина действительно приводит к ингибированию канонического BMP сигнального пути в эпидермальных и волосяных кератиноцитах.

K14-Noggin мыши рождались жизнеспособными,

и у новорожденных TG мышей при визуальном и гистологическом исследовании не было выявлено нарушений в развитии кожи и других органов по сравнению с контрольной группой животных. Однако, у всех TG животных на третьей неделе постнатального развития на коже спины наблюдалось выпадение волос (рис. 2A). Процесс выпадения волос носил прогрессивный характер с вовлечением других

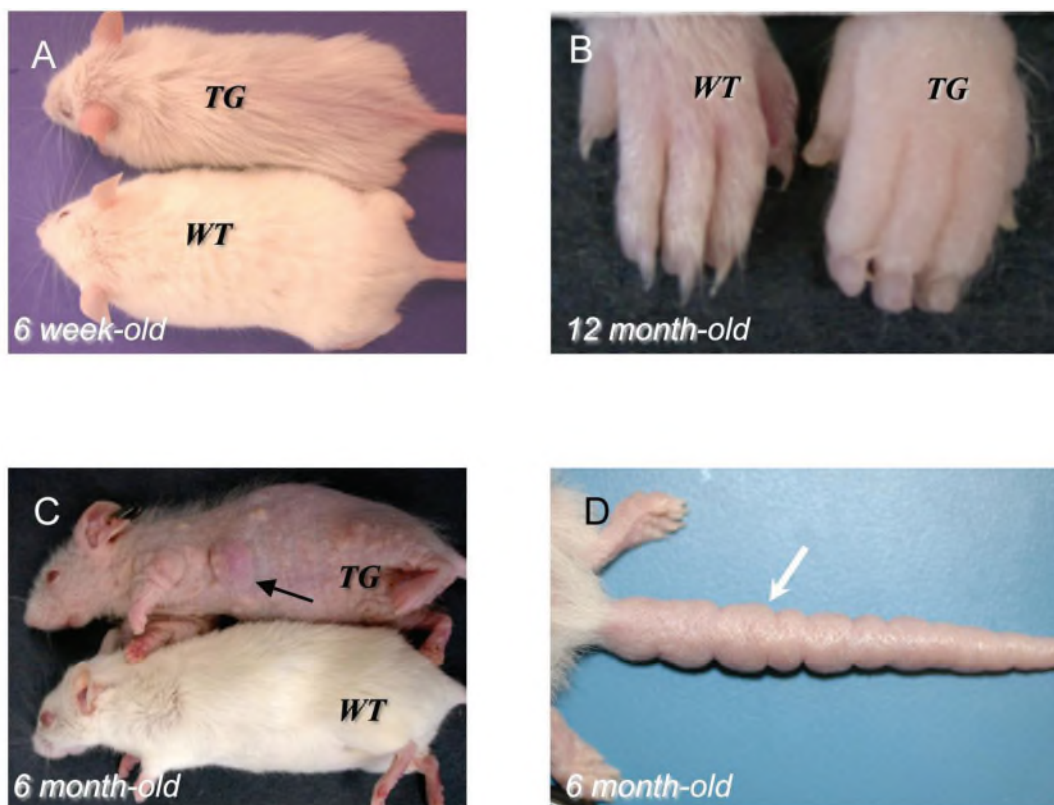


Рис. 2 - Внешний фенотип K14-Noggin мышей

(А) Прогрессирующее выпадение волос; **(В)** Гипертрофические изменения ногтей у TG мышей; **(С)** Множественные опухоли кожи у TG мышей (стрелка указывает на опухоли); **(D)** Множественные опухоли на хвосте (стрелка).

участков тела, при этом около 60% взрослых TG мышей практически полностью лишены волосяного покрова к 8-10 неделям после рождения без последующего восстановления волосяного покрова (рис. 2А). Обращали на себя внимание также и развивающиеся с возрастом у TG мышей гипертрофические изменения ногтевых фаланг, что проявлялось их утолщением и потерей остроконечной формы, чего не наблюдалось у мышей контрольной группы соответствующего возраста (рис. 2В).

Наиболее значительным характерным признаком K14-Noggin мышей явилось спонтанное развитие у практически всех TG животных опухолей кожи, которые становились видимыми к 3-6 месяцам постнатального развития. Как правило, эти опухоли были множественными с различной локализацией, но преимущественно они появлялись на коже спины и живота, а также на хвосте (рис. 2D, стрелки).

Выводы

Таким образом, в данной работе впервые показано, что ингибирование активности BMP у K14-Noggin трансгенных мышей приводит к выпадению волос и развитию эпителиальных опухолей кожи.

Библиографический список

1. What is the 'true' function of skin? / С.М. Chuong, В.Ј. Nickoloff, Р.М. Elias, L.А. Goldsmith, E. Macher, P.А. Maderson [et al.] // *Exp Dermatol.* - 2002. - 11:159-87.
2. Мардарьев, А.Н. Роль Sbx4 в заживлении кожных ран у мышей / А.Н. Мардарьев, Н.В. Мардарьева // Научно-образовательная среда как основа развития агропромышленного комплекса и социальной инфраструктуры села. Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 85 – летию Чувашской ГСХА. - Чебоксары: ФГБОУ ВО Чувашская ГСХА, 2016. - С. 305-310.
3. Мардарьев, А.Н. Роль Sbx7 в регуляции миграции кератиноцитов при заживлении кожных ран у мышей / А.Н. Мардарьев, Н.В. Мардарьева, Г.А. Ларионов // *Вестник Чувашской государственной сельскохозяйственной академии.* - 2017. - № 3(3). - С. 56-62.
4. Мардарьев, А.Н. Контроль поликомбного белка Sbx7 в пролиферации кератиноцитов в мышиной коже / А.Н. Мардарьев, Н.В. Мардарьева // Биологизация земледелия - основа воспроизводства плодородия почвы. Материалы международной научно-практической конференции, посвящен-

ной 60-летию со дня рождения доктора сельскохозяйственных наук, профессора, академика РАСХН Леонида Геннадьевича Шашкарова. – Чебоксары: ФГБОУ ВО Чувашская ГСХА, 2018. - С. 171-178.

5. Millar, S.E. Molecular mechanisms regulating hair follicle development / S.E. Millar // *J Invest Dermatol.* – 2002. - 118:216-25

6. The structure and development of skin / D. Chu, L.A. Goldsmith [ed.] // *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine* McGraw-Hill. - New York, 2012. - P. 58-75.

7. Bone morphogenetic protein in melanoma: angel or devil? / M.Y. Hsu, S. Rovinsky, S. Penmatcha, M. Herlyn, D. Muirhead // *Cancer Metastasis Rev.* – 2005. - 24:251-63

8. Botchkarev, V.A. Bone morphogenetic proteins and their antagonists in skin and hair follicle biology / V.A. Botchkarev // *J Invest Dermatol.* - 2003. - 120:36-47

9. Local inhibitory action of BMPs and their relationships with activators in feather formation: implications for periodic patterning / H.S. Jung, P.H. Francis West, R.B. Widelitz, T.X. Jiang, S. Ting Berreth, C. Tickle [et al.] // *Dev Biol.* – 1998. - 196:11-23.

10. Zhang, J. BMP signalling and stem cell regulation / J. Zhang, L. Li // *Dev Biol.* - 2005. - 284:1- 11

11. The activation level of the TNF family receptor, Edar, determine cusps number and tooth number during tooth development / A. Tucker, D. Headon, J. Courtney, P. Overbeek, P. Sharpe // *Dev Biol.* – 2004. - 268:185-94

12. FVB/N mice: an inbred strain sensitive to the chemical induction of squamous cell carcinomas in the skin / H. Hennings, A. Glick, D. Lowry, L. Krsmanovic, L. Sly, S. Yuspa // *Carcinogenesis.* – 1993. - 14:2353-8

13. Transgenic studies with a keratin promoter-driven growth hormone transgene: prospects for gene therapy / X. Wang, S. Zinkel, K. Polonsky, E. Fuchs // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1997. - 94:219-26

BMP OF SIGNALING PATH IN THE DEVELOPMENT OF SKIN TUMORS

Mardaryev A.N.¹, Mardaryeva N.V.², Larionov G.A.²

¹Bradford University

²Chuvash State Agricultural Academy,

¹United Kingdom, Richmod Road, Bradford, BD7 1DP

²428003, Cheboksary, Karl Marx st., 29; Tel: 89278411221; e-mail: a.mardaryev@bradford.ac.uk

Keywords: skin, bone morphogenetic proteins, noggin.

The article presents results of studying the role and identification of molecular mechanisms for involvement of BMP of signaling pathway in the development of skin tumors using transgenic mice, over-expressing BMP antagonist noggin under the control of keratin gene 14 promoter (K14-Noggin). To study the role of BMP in the development of skin tumors, a transgenic (TG) line of mice was created, over-expressing BMP antagonist of noggin under the control of the keratin gene 14 promoter. To carry out the study, we took skin samples from mice in the following periods: 20, 24, 28, 32, 36, 40 days of postnatal ontogenesis (P0 - P40, respectively), as well as at the period of 12-24 weeks. For each time period, 5-7 mice of the experimental and control line were selected. After sampling, skin samples were immediately frozen in liquid nitrogen and enclosed in embedding medium (Tissue-Tek, OST 4583 Compound, Sakura, USA) and then stored at -80 °C. Experiments on animals were carried out according to protocols approved by the University of Bradford (license PPL 40/2989) and Chuvash State Agricultural Academy. The data suggest that inhibition of BMP of signaling pathways leads to formation of epithelial skin tumors. Maintaining the activity of BMP of signaling pathways in the skin is one of the factors preventing the transformation of epithelial cells into tumor cells. Thus, transgenic expression of noggin actually leads to inhibition of canonical BMP of signaling pathway in the epidermal and hair keratinocytes.

Bibliography

1. What is the 'true' function of skin? / C.M. Chuong, B.J. Nickoloff, P.M. Elias, L.A. Goldsmith, E. Macher, P.A. Maderson [et al.] // *Exp Dermatol.* - 2002. - 11:159-87.
2. Mardaryev, A.N. The role of Cbx4 in the healing of skin wounds of mice / A.N. Mardaryev, N.V. Mardaryeva // *Scientific-educational environment as the basis for the development of the agro-industrial complex and the social infrastructure of the village. Materials of the international scientific-practical conference dedicated to the 85th anniversary of Chuvash State Agricultural Academy.* - Cheboksary: Chuvash State Agricultural Academy, 2016. - P. 305-310.
3. Mardaryev, A.N. The role of Cbx7 in regulation of keratinocyte migration in the healing of skin wounds of mice / A.N. Mardaryev, N.V. Mardaryeva, G.A. Larionov // *Vestnik of Chuvash State Agricultural Academy.* - 2017. - № 3 (3). - P. 56-62.
4. Mardaryev, A.N. Control of polycomb protein Cbx7 in the proliferation of keratinocytes of mouse skin / A.N. Mardaryev, N.V. Mardaryeva // *Biologization of agriculture - the basis of soil fertility reproduction. Materials of the international scientific-practical conference dedicated to the 60th anniversary of the birth of Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Academician of RAS Leonid Gennadyevich Shashkarov.* - Cheboksary: Chuvash State Agricultural Academy, 2018. - P. 171-178.
5. Millar, S.E. Molecular mechanisms regulating hair follicle development / S.E. Millar // *J Invest Dermatol.* – 2002. - 118:216-25
6. The structure and development of skin / D. Chu, L.A. Goldsmith [ed.] // *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine* McGraw-Hill. - New York, 2012. - P. 58-75.
7. Bone morphogenetic protein in melanoma: angel or devil? / M.Y. Hsu, S. Rovinsky, S. Penmatcha, M. Herlyn, D. Muirhead // *Cancer Metastasis Rev.* – 2005. - 24:251-63
8. Botchkarev, V.A. Bone morphogenetic proteins and their antagonists in skin and hair follicle biology / V.A. Botchkarev // *J Invest Dermatol.* - 2003. - 120:36-47
9. Local inhibitory action of BMPs and their relationships with activators in feather formation: implications for periodic patterning / H.S. Jung, P.H. Francis West, R.B. Widelitz, T.X. Jiang, S. Ting Berreth, C. Tickle [et al.] // *Dev Biol.* – 1998. - 196:11-23.
10. Zhang, J. BMP signalling and stem cell regulation / J. Zhang, L. Li // *Dev Biol.* - 2005. - 284:1- 11
11. The activation level of the TNF family receptor, Edar, determine cusps number and tooth number during tooth development / A. Tucker, D. Headon, J. Courtney, P. Overbeek, P. Sharpe // *Dev Biol.* – 2004. - 268:185-94
12. FVB/N mice: an inbred strain sensitive to the chemical induction of squamous cell carcinomas in the skin / H. Hennings, A. Glick, D. Lowry, L. Krsmanovic, L. Sly, S. Yuspa // *Carcinogenesis.* – 1993. - 14:2353-8
13. Transgenic studies with a keratin promoter-driven growth hormone transgene: prospects for gene therapy / X. Wang, S. Zinkel, K. Polonsky, E. Fuchs // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1997. - 94:219-26