

УДК 576.54

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *ZEB2* В СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ТКАНИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ПРОТОВОКОВОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЕ, ПАНКРЕАТИТЕ И В НОРМЕ

© 2013 г. Е. В. Усова, М. Р. Копанцева, М. Б. Костина,
А. Н. Ванькович, В. И. Егоров, Е. П. Копанцев

Представлено академиком Е.Д. Свердловым 24.07.2012 г.

Поступило 26.07.2012 г.

DOI: 10.7868/S0869565213050307

Рак поджелудочной железы (РПЖ) — одна из главных причин смерти больных онкологического профиля в мире и в Российской Федерации с пятилетней выживаемостью больных, не превышающей 5%. Таким образом, РПЖ представляет собой крайне опасное заболевание с очень неблагоприятным прогнозом [1]. Злокачественные опухоли поджелудочной железы состоят не только из генетически измененных эпителиальных клеток, но и содержат значительное количество стромальных клеток опухолевого микроокружения. Присутствие большого количества активированных стромальных клеток и белковых продуктов их жизнедеятельности в опухоли создает препятствие для препаратов противоопухолевой терапии [2]. Происхождение опухолевых стромальных клеток и в первую очередь мезенхимальных клеток опухолевого окружения до конца не определено. Одним из возможных механизмов образования стромального компонента опухолей поджелудочной железы может быть эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) — процесс трансдифференцировки эпителиальных клеток в мезенхимальные [3]. Целью данной работы был анализ экспрессии гена *ZEB2*, кодирующего важный регулятор эпителиально-мезенхимального перехода, в стромальных клетках протоковой аденокарциномы поджелудочной железы. Члены семейства *ZEB* Zn-фингерных транскрипционных активаторов/репрессоров играют важную роль в ходе нормального эмбрионального

развития [4] и поэтому можно полагать, что они могут быть также вовлечены как причинные факторы в развитие опухолевых процессов [5].

В работе проводили сравнительное исследование экспрессии гена *ZEB2* в культивируемых стромальных клетках нормальной поджелудочной железы, стромальных клетках ткани при панкреатите и стромальных клетках, полученных из ткани протоковой аденокарциномы поджелудочной железы. Также исследовали возможное влияние повышенной экспрессии гена фактора транскрипции *ZEB2* в опухолевых клетках поджелудочной железы на активность промоторов генов, важных для опухолевой прогрессии.

Для экспериментов использовали первичные культуры опухолевых стромальных клеток, полученные из хирургических образцов от пациентов, оперированных по поводу рака поджелудочной железы в Институте хирургии им. А.В. Вишневского. Образец нормальной ткани был взят из неизменной части хирургического образца от пациента, оперированного по поводу цистаденомы поджелудочной железы. Первичная культура стромальных клеток панкреатита получена из хирургического образца от пациента, оперированного по поводу хронического панкреатита. Получение и условия культивирования стромальных клеток поджелудочной железы, а также вестерн-блот-анализ клеточных лизатов описаны нами ранее [6]. Результаты вестерн-блот-анализа обрабатывали с помощью программы Quantity One (“Bio-Rad”, США). Опухолевые клетки рака поджелудочной железы PANC-1, MIA PaCa-2, AsPC-1, Sarpa-2, а также клетки почки человека HEK 293 культивировали в среде DMEM/F12 (1 : 1) с 10% ФКС (фетальной коровьей сывороткой) при 37°C в CO₂-инкубаторе. В экспериментах по котрансфекции были использованы следующие плазмиды: pcDNA3.1-hu *ZEB2*, содержащая полноразмерную вставку кДНК *ZEB2* человека [7]; pGL3-ECadh-Luc, содержащая встав-

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова
Российской Академии наук, Москва
Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта
Российской Академии наук, Москва
Институт хирургии им. А.В. Вишневского,
Москва

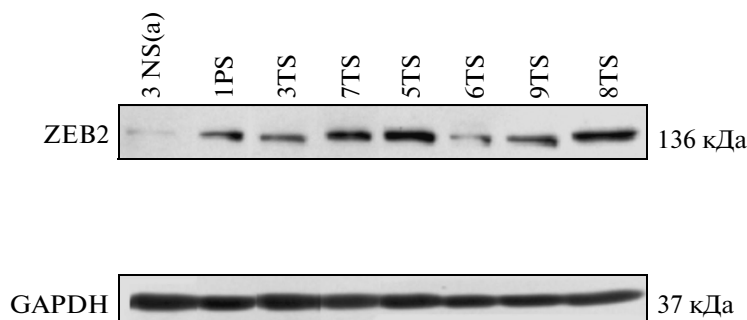


Рис. 1. Вестерн-блот-анализ белка *ZEB2* в лизатах первичной культуры нормальных стромальных клеток поджелудочной железы (3NS(a)), первичной культуры стромальных клеток ткани панкреатита (1PS) и опухолевых стромальных клеток рака поджелудочной железы (3TS, 7TS, 5TS, 6TS, 9TS, 8TS). Дополнительно мембраны проявляли антителами против GAPDH для контроля качества и количества нанесенного лизата.

ку (323 н.п.) промотора гена *CDH1* человека [8]; pGL3-SM α -actin-Luc, содержащая вставку (5368 н.п.) промотора гена *Acta2* крысы [9]; pGL3-Vim-Luc, содержащая вставку (410 н.п.) промотора гена *VIM* человека [10], и pGL3-Surv-Luc, содержащая вставку (1456 н.п.) промотора гена *BIRC5* человека [11]. Транзientную трансфекцию клеток проводили с помощью реагента Lipofectamine 2000 согласно рекомендациям производителя (“Invitrogen”, США). Активности люцифераз светлячка и *R. reniformis* были измерены в экстрактах через 48 ч после трансфекции с помощью набора реактивов для определения двойной люциферазы компании “Promega” (США) на приборе GENios Pro (“Tecan”, Австрия). Эксперименты по трансфекции клеток проводили, как минимум, в трех повторностях.

Экспрессию гена *ZEB2* исследовали методом вестерн-блот-анализа белка *ZEB2* в лизатах клеток 6 первичных культур опухолевых стромальных клеток и клеток первичной культуры ткани при панкреатите, сравнивая с нормальными стромальными клетками поджелудочной железы. Проведенный анализ выявил повышенное содержание белка *ZEB2* в лизатах опухолевых стромальных клеток поджелудочной железы и клеток при панкреатите по сравнению с нормальными стромальными клетками (рис. 1).

Для анализа функционального эффекта повышенной экспрессии гена *ZEB2* в эпителиальных клетках рака поджелудочной железы нами выбран метод анализа активности репортерных ДНК-конструкций, содержащих промоторные области генов-маркёров клеточной дифференцировки (Е-кадгерин, виментин и гладкомышечный актин), а также гена *BIRC5*, кодирующего антиапоптотический опухолеспецифический белок сурвивин. Для определения эффекта экспрессии гена *ZEB2* проводили котрансфекцию клеток плазмидой pCDNA3.1-hu *ZEB2* с полноразмерной вставкой кДНК *ZEB2* человека и репортерной плазмидой, содержащей вставку исследуемого промотора.

Эффект экспрессии гена *ZEB2* анализировали в 4 различных клеточных линиях рака поджелудочной железы (PANC-1, MIA PaCa-2, AsPC-1 и Capan-2), а также в контрольной линии клеток HEK 293 (рис. 2). Повышенная экспрессия гена *ZEB2* приводила к ингибированию промотора гена *CDH1* в двух (PANC-1 и MIA PaCa-2) из четырех исследованных клеточных линиях рака поджелудочной железы и активированию промотора гена *VIM* в трех клеточных линиях рака поджелудочной железы (MIA PaCa-2, AsPC-1 и Capan-2). Также для двух линий клеток (MIA PaCa-2 и AsPC-1) нами был показан ингибирующий эффект экспрессии гена *ZEB2* на активность промотора гена гладкомышечного актина (ГМ-Актин) — маркёра дифференцировки миофибробластов. Интересно, что во всех исследованных клеточных линиях рака поджелудочной железы повышенная экспрессия гена *ZEB2* приводила к усилению активности промотора гена сурвивина (ген *BIRC5* человека).

Эффект повышенной экспрессии гена *ZEB2* на активность исследованных генов был проверен в экспериментах по трансфекции клеток AsPC-1 плазмидой pCDNA-hu *ZEB2* и определению уровня эндогенных белков — Е-кадгерин, виментин, гладкомышечный актин и сурвивин методом вестерн-блот-анализа клеточных лизатов трансфицированных клеток (рис. 3). Обнаружено, что в трансфицированных плазмидой pCDNA3.1-hu *ZEB2* клетках AsPC-1 по сравнению с контрольными клетками снижался эндогенный уровень белков Е-кадгерина (в 0.83 раза) и гладкомышечного актина (в 0.39 раза). В то же время увеличивалось содержание белков виментина (в 2.3 раза) и сурвивина (в 2.2 раза). Таким образом, полученные результаты вестерн-блот-анализа находятся в хорошем соответствии с данными анализа репортерных промоторных ДНК-конструкций.

Ранее нами было показано, что стромальные клетки опухолей поджелудочной железы производят разнообразные ростовые факторы, обладающие трансформирующей и стимулирующими

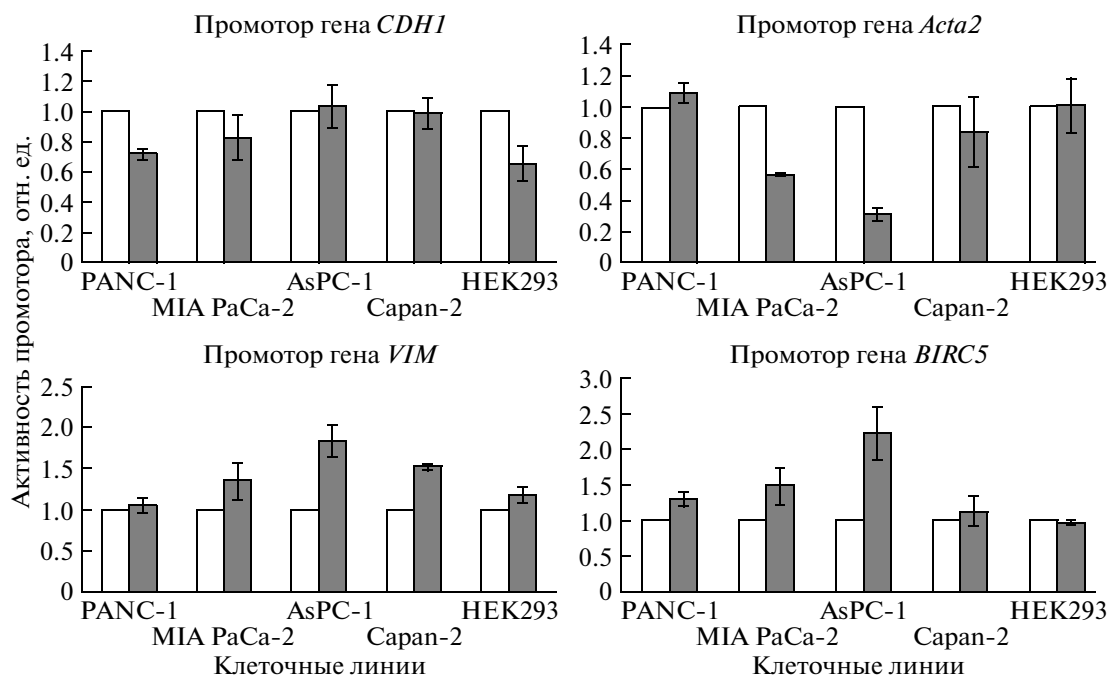


Рис. 2. Эффект повышенной экспрессии гена *ZEB2* в эпителиальных клетках рака поджелудочной железы (PANC-1, MIA PaCa-2, AsPC-1, Capan-2) на активность промоторов гена *CDH1*, гена *Acta 2*, гена *VIM* и гена *BIRC5*. В экспериментах по котрансфекции были использованы: плазмида pсDNA3.1-hu *ZEB2* (темные прямоугольники) и контрольный вектор pсDNA3.1-Neo (белые прямоугольники). В качестве репортерных конструкций использовали плазмиды pGL3-ECadh-Luc, pGL3-SM α -actin-Luc, pGL3-Vim-Luc и pGL3-Surv-Luc. На диаграммах представлены результаты определения активности исследованных промоторов относительно контрольных трансфекций вектором pсDNA3.1-Neo, не содержащим вставку гена *ZEB2*.

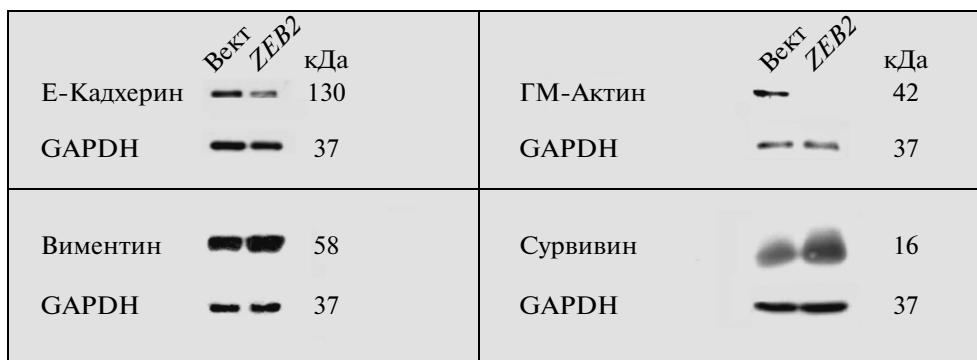


Рис. 3. Эффект повышенной экспрессии гена *ZEB2* в эпителиальных клетках рака поджелудочной железы AsPC-1 на содержание эндогенных белков Е-кадгерина, виментина, гладкомышечного актина и сурвивина. Дополнительно мембраны проявляли антителами против GAPDH для контроля качества и количества нанесенного лизата.

клеточный рост активностями [12]. В частности, продемонстрировано присутствие в кондиционированных средах стромальных клеток белковых факторов TGF- β , HGF и IGF1, которые в определенном клеточном контексте являются эффективными индукторами синтеза белков-регуляторов эпителиально-мезенхимального перехода (SNAIL, TWIST, ZEB1 и ZEB2) в опухолевых и нормальных эпителиальных клетках. В настоящем сообщении мы показали, что содержание белкового

продукта гена *ZEB2* повышено в первичных культурах стромальных клеток при раке поджелудочной железы и при панкреатите по сравнению с нормальными стромальными клетками. Мы также демонстрируем факт, что повышенная экспрессия гена *ZEB2* приводит к репрессии гена *CDH1* и повышению активности гена *VIM* в клетках рака поджелудочной железы, что свидетельствует о возможной индукции процесса EMT в трансфицированных клетках. Существенный ин-

терес представляет обнаруженный стимулирующий эффект повышенной экспрессии гена *ZEB2* на активность гена *BIRC5*. Это позволяет предположить появление в трансфицированных культурах трансформированных клеток со свойствами стволовых клеток [13, 14]. В целом наши данные могут служить доводами в пользу того, что индуцированный ЭМП-процесс может быть одним из механизмов генерации мезенхимальных клеток опухолевого микроокружения поджелудочной железы.

Авторы выражают глубокую признательность Dr. E. Tulchinsky (Leicester, UK), Dr. Y. Ihara (Kimi-idera, Japan), Dr. S. Rittling (Boston, USA), Dr. C. Mack (Chapel Hill, USA) и М. Митяеву (Москва, РФ) за любезно предоставленные ДНК-конструкции.

Работа поддержана грантом РФФИ 11-04-12069-офи-м-2011, программой Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" и грантом НШ-1674.2012.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hidalgo M.* // *N. Engl. J. Med.* 2010. V. 362. P. 1605–1617.
2. *Neesee A., Milch P., Frese K.K., et al.* // *Gut.* 2011. V. 60. P. 861–868.
3. *Kalluri R., Weinberg R.A.* // *J. Clin. Invest.* 2009. V. 119. P. 1420–1428.
4. *Vandewalle C., Van Roy F., Berx G.* // *Cell. Mol. Life Sci.* 2009. V. 66. P. 773–787.
5. *Kopantzev E., Monastyrskaya G., Vinogradova T., et al.* // *Lung Cancer.* 2008. V. 62. P. 23–34.
6. *Kopantzev E., Vayshlya N., Kopantseva M., et al.* // *Brit. J. Cancer.* 2010. V. 102. P. 1533–1540.
7. *Mejlvang J., Kriajevska M., Vandewalle C., et al.* // *Mol. Biol. Cell.* 2007. V. 18. P. 4615–4624.
8. *Hayashida Y., Urata Y., Muroi E., et al.* // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 32469–32484.
9. *Lockman K., Hinson J.S., Medlin M.D., et al.* // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 42422–42430.
10. *Yates B., Zettenberg C., Rajeev V., et al.* // *Exp. Cell Res.* 2007. V. 313. P. 3718–3728.
11. *Митяев М.В., Копанцев Е.П., Буздин А.А. и др.* // *Биохимия.* 2009. Т. 73. С. 1183–1191.
12. *Копанцев Е.П., Мелехина О.В., Копанцева М.Р. и др.* // *ДАН.* 2009. Т. 429. № 3. С. 416–419.
13. *Mani S.A., Guo W., Liao M.J., et al.* // *Cell.* 2008. V. 133. P. 704–715.
14. *Floor S., van Staveren W.C.G., Larsimont D., et al.* // *Oncogene.* 2011. V. 30. P. 3718–3728.