

На правах рукописи

Григорьева Эльвира Витальевна

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ СИСТЕМЫ БИОСИНТЕЗА
ГЕПАРАНСУЛЬФАТА В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

03.01.07 – молекулярная генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Новосибирск – 2018

Работа выполнена в Институте молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Официальные оппоненты:

Красильников Михаил Александрович,
доктор биологических наук, профессор,
директор НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ
онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава
России, г. Москва

Толстикова Татьяна Генриховна,
доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией фармакологических
исследований, ФГБУН Институт органической
химии СО РАН, г. Новосибирск

Рыкова Елена Юрьевна,
доктор биологических наук,
старший научный сотрудник лаборатории
молекулярной медицины, ФГБУН Институт
химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, г. Новосибирск

Ведущая организация:

ФГБНУ «Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук», г.
Томск

Защита состоится «31» октября 2018 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 003.074.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН (630090, Новосибирск, пр. академика Лаврентьев, 8/2) тел: +7-383-373-02-49, e-mail: ovant@mcb.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН www.mcb.nsc.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Антоненко О.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Понимание молекулярных механизмов канцерогенеза остается актуальной проблемой современной биологии. И одним из наименее исследованных аспектов этой проблемы является участие полисахаридных макромолекул в процессе злокачественной трансформации. Одним из важнейших типов гликозилированных молекул являются протеогликаны (ПГ), состоящие из корового белка и ковалентно присоединенных углеводных цепей гликозаминогликанов различного типа (в том числе гепарансульфатов) (Lindahl, 2014; Couchman *et al.*, 2010). Гепарансульфат протеогликаны (ГСПГ) локализованы в основном на поверхности клеток и во внеклеточном матриксе, где выполняют множество различных функций, связанных с поддержанием межклеточных контактов и передачей сигнальной информации (Bishop *et al.*, 2007; Bernfield *et al.*, 1999). Функциональная активность ГСПГ в значительной степени определяется именно их углеводными цепями гепарансульфатов (ГС), которые характеризуются чрезвычайно гетерогенной структурой и высоким отрицательным зарядом и обеспечивают взаимодействие ГСПГ с множеством различных лигандов (Gallagher, 2015; Turnbull *et al.*, 2001). При злокачественной трансформации клеток и тканей происходят значительные изменения в структуре и локализации молекул ГСПГ, которые приводят к нарушению межклеточных взаимодействий и способствуют трансформации внеклеточного матрикса в опухолевое микроокружение (Theocharis *et al.*, 2010). Однако в основном это относится к коровым белкам соответствующих ГПСГ, а вклад углеводных цепей гепарансульфата и системы их биосинтеза в процесс канцерогенеза остается мало изученным.

Степень разработанности темы исследования

Особенность гепарансульфат протеогликанов заключается в том, что наряду с коровым белком, углеводные цепи гепарансульфата в значительной мере определяют общую структурную и функциональную активность сложной макромолекулы протеогликана (Li, Kusche-Gullberg, 2016) и если вовлеченность ПГ в процесс злокачественной трансформации на уровне их коровых белков убедительно показана для целого ряда индивидуальных ГСПГ (синдекан-1, глипиканы-1, 3 и -4, перлекан) (Wiksten *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2008; Bix *et al.*, 2008), то вклад их углеводных цепей изучен намного слабее (Xiong *et al.*, 2014; Lindahl, Kjellen, 2013). Тем не менее, и коровые белки ГСПГ, и их углеводные цепи ГС рассматриваются в настоящее время как перспективные цели для разработки новых антиопухолевых препаратов (Weiss *et al.*, 2017; Lanzi *et al.*, 2017).

В этом контексте, особое внимание привлекает также биосинтез гепарансульфата, поскольку этот процесс осуществляется нематрично и всецело определяется системой биосинтетических ферментов (Kreuger, Kjellen, 2012; Zhang *et al.*, 2010), составляющих так называемую "ГАГосому" (или "гепараносому") (Esko, Selleck, 2002; Turnbull *et al.*, 2001). В то же время вопрос о том, осуществляется ли координация системы биосинтеза ГС исключительно на уровне белковых молекул этих ферментов (непосредственно в комплексе Гольджи) или она может согласовываться на уровне транскрипционной активности соответствующих генов, остается неизвестным.

Вовлеченность ферментов биосинтеза ГС в процесс канцерогенеза показана на уровне некоторых индивидуальных генов/ферментов биосинтеза (Nadanaka, Kitagawa, 2008), нарушения экспрессии и/или функциональной активности которых тесно ассоциированы с инициацией и развитием опухолевого процесса и являются перспективными биомаркерами и целями для диагностики и создания новых анти-опухолевых препаратов (Lanzi *et al.*, 2017).

Однако минимум 2 аспекта этого вопроса остаются совершенно неизученными:

1. как изменения экспрессии индивидуальных генов биосинтеза ГС в опухолевых клетках отражаются на транскрипционном профиле этой системы как "целого"?
2. являются ли эти изменения универсальным признаком процесса злокачественной трансформации или носят тканеспецифичный характер?

Для ответа на эти вопросы нами был использован оригинальный подход, связанный с комплексным исследованием системы биосинтеза ГС как возможной причины нарушения содержания/локализации гепарансульфата в злокачественных опухолях различной этиологии.

Цели и задачи исследования

Целью данного исследования является комплексное изучение транскрипционной активности системы биосинтеза гепарансульфата и экспрессии гепарансульфат протеогликанов в различных нормальных и опухолевых тканях человека, а также регуляция и функциональная роль ключевого компонента этой системы (гена Д-глюкуронил С5-эпимеразы) в процессе канцерогенеза.

В соответствии с целью, были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить транскрипционную активность и общий паттерн экспрессии генов системы биосинтеза гепарансульфата в различных нормальных и опухолевых тканях человека и изучить тканеспецифичность экспрессии этой системы.
2. Провести комплексный анализ и сопоставить нарушения синтеза углеводных цепей гепарансульфата и их коровых белков в процессе канцерогенеза.
3. Определить уровень экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы в нормальных и опухолевых клетках и тканях рака легкого, молочной и предстательной железы, глиом человека.
4. Исследовать молекулярные механизмы регуляции экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы в нормальных и опухолевых тканях.
5. Изучить функциональную роль гена Д-глюкуронил С5-эпимеразы в отношении опухолевых клеток рака легкого, молочной и предстательной железы человека в экспериментальных системах *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна работы

В данном исследовании был впервые проведен комплексный анализ транскрипционной активности генов всех ключевых ферментов системы метаболизма гепарансульфата как в нормальной ткани, так и в опухолях различного морфологического происхождения. Показано, что система биосинтеза углеводных молекул ГС функционирует по тканеспецифичному принципу - для каждой ткани организма человека характерен специфический паттерн транскрипционной активности генов, кодирующих компоненты

этой системы. В процессе злокачественной трансформации происходят количественные и качественные изменения в транскрипционной активности генов, кодирующих ферменты биосинтеза ГС, которые, с одной стороны, носят гетерогенный характер, и с другой стороны, сохраняют элементы тканеспецифичности происходящих нарушений.

Разностороннее изучение одного из ключевых компонентов этой биосинтетической системы - гена Д-глюкуронил С5-эпимеразы человека (*GLCE*) также выявило тканеспецифичность его экспрессии во всех изученных нормальных тканях человека, которая подвергается значительным изменениям в опухолевых тканях *in vivo* и клеточных линиях *in vitro*. Впервые показано, что регуляция Д-глюкуронил С5-эпимеразы осуществляется через сложный механизм, действующий как на транскрипционном, так и на трансляционном уровнях - через структуру хроматина, метилирование промоторной области *GLCE*, участие TCF4/ β -катенинового комплекса и микроРНК-218. Дополнительный вклад в уровень экспрессии *GLCE* может вносить генетическая составляющая, взаимосвязанная с наличием функционально значимых полиморфных вариантов этого гена. Такая сложная регуляция экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы, по-видимому, взаимосвязана с тканеспецифичностью ее экспрессии и многообразием ее нарушений в опухолевых тканях. С функциональной точки зрения, ген *GLCE* был впервые идентифицирован в качестве гена-супрессора развития опухоли (Tumour-Suppressor Gene, TSG), способного оказывать антипролиферативное воздействие на культуру опухолевых клеток (рака молочной железы линии MCF7, рака предстательной железы линии LNCaP и мелкоклеточного рака легкого линии U2020) *in vitro* и подавлять рост экспериментальных опухолей у иммунодефицитных мышей линии SCID в системе *in vivo*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Понимание молекулярных механизмов канцерогенеза является важной фундаментальной проблемой современной онкологии, от решения которой во многом зависит разработка новых диагностических и прогностических биомаркеров и выявление перспективных целей для создания анти-опухолевых препаратов нового поколения. Полученные в ходе выполнения данной работы фундаментальные данные подтверждают важность системы биосинтеза гепарансульфата в процессах нормальной жизнедеятельности и злокачественной трансформации клеток и тканей и открывают возможность использования гепарансульфата в качестве полисахаридного биомаркера злокачественной трансформации тканей и прогноза течения заболевания. Также полученные результаты о системных изменениях транскрипционной активности генов, кодирующих ферменты системы биосинтеза ГС, и их паттернов экспрессии в различных типах опухолей впервые позволяют говорить о новом перспективном направлении по молекулярной коррекции работы этой биосинтетической системы и восстановлению нормальной структуры углеводных цепей ГС в патологических клетках и тканях.

Тканеспецифичность изменений системы биосинтеза ГС в процессе злокачественной трансформации клеток и тканей также является интересным открытием и теоретически позволяет задуматься о принципиальной возможности создания тканеспецифичных препаратов для антиопухолевой терапии, которые могли бы избирательно действовать на опухоли заданного типа, не влияя при этом на другие ткани организма.

Другое направление практического использования полученных результатов связано с выявленной опухоль-супрессирующей активностью гена Д-глюкуронил С5-эпимеразы, способного подавлять пролиферацию опухолевых клеток *in vitro* и рост экспериментальных опухолей мелкоклеточного рака легкого *in vivo*. Этот результат создает основу для дальнейших исследований гена Д-глюкуронил С5-эпимеразы как возможного кандидата для генотерапии злокачественных новообразований, а полученные данные о снижении уровня экспрессии гена Д-глюкуронил С5-эпимеразы не только в опухоли молочной железы, но и в морфологически неизменной ткани, окружающей опухоль, привлекают внимание к этому гену как новому возможному маркеру доклинической диагностики рака молочной железы.

Методология и методы исследования

Для выполнения данного исследования была предложена стратегия, основанная на детальном изучении паттернов и уровней транскрипционной активности основных генов системы биосинтеза ГС (*EXT1/EXT2*, *NDST1/2*, *GLCE*, *2OST1/HS2ST1*, *3OST1/HS3ST1*, *3OST2/HS3ST2*, *6OST1/HS6ST1*, *6OST2/HS6ST2*, *SULF1/2*, *HPSE*) в различных нормальных и опухолевых клетках и тканях. Ключевым моментом такого подхода является использование одинаковых методов исследования и применение единой системы получения и обработки биологических образцов. Это позволяет провести сравнительный анализ системы биосинтеза ГС в различных опухолях и оценить ее состояние как единого функционального механизма, когда не только транскрипционная активность индивидуальных генов имеют значение, но и их определенное соотношение и взаимодействие в качестве компонентов единой функциональной системы, осуществляющей полный производственный цикл по биосинтезу гепарансульфата.

С другой стороны, изучение системы как "целого" не позволяет проводить функциональные тесты по ее экспериментальной регуляции, так как до настоящего времени совершенно неясно, что могло бы служить ее регулятором. Непрямым подходом к изучению этого вопроса является детальный анализ одного из ключевых звеньев этой системы, для которого можно в полной мере воспользоваться современными методами по экспериментальной регуляции экспрессии и активности изучаемого гена. На момент начала нашего исследования, наиболее перспективным кандидатом для проведения такого исследования являлся ген Д-глюкуронил С5-эпимеразы (*GLCE*), который является одним из ключевых в процессе биосинтеза молекул ГС и в то же время наименее изученным, в отличие от остальных ферментов биосинтеза гепарансульфата.

Основными методами при выполнении данного исследования были как общепринятые методы молекулярного анализа (ОТ-ПЦР в реальном времени, Вестерн-блот, метил-специфичная ПЦР, бисульфитное секвенирование, клонирование кДНК, эксперименты на культурах клеток *in vitro*, оценка жизнеспособности и пролиферативной активности клеток), так и современные методы исследования (совместное культивирование различных типов клеток *in vitro*, иммуногистохимический и иммуноцитохимический анализ углеводных эпитопов ГС, эксперименты на иммунодефицитных мышах SCID *in vivo*, коммерческие наборы для определения молекулярных механизмов канцерогенеза и действия транскрипционных факторов (SABioscience, США)).

Положения, выносимые на защиту

1. Транскрипционная активность и паттерн экспрессии основных генов системы биосинтеза углеводных цепей гепарансульфата носят тканеспецифичный характер. В опухолевых тканях происходят разнонаправленные нарушения системы биосинтеза ГС, свидетельствующие о дисбалансировке процессов ее регуляции, и прослеживается отчетливая тенденция к тканеспецифичности этих изменений в опухолях различной этиологии.
2. В процессе канцерогенеза, различные типы опухолей характеризуются специфическими комбинациями изменений транскрипционной активности генов системы биосинтеза углеводных цепей ГС и генов, кодирующих коровые белки гепарансульфат протеогликанов.
3. Ген Д-глюкуронил С5-эпимеразы человека экспрессируется во всех исследованных тканях человека, с наивысшим уровнем экспрессии в молочной железе и легком и наименьшей экспрессией в тканях почки, тимуса и щитовидной железы. В злокачественных опухолях человека происходит значительное снижение уровня экспрессии этого гена.
4. Экспрессия Д-глюкуронил С5-эпимеразы определяется как на генетическом уровне (наличие *GLCE* полиморфизма rs3865014 (A>G, Val597Ile) с различной транскрипционной активностью этого гена), так и регулируется на эпигенетическом уровне через сложный молекулярный механизм, включающий в себя гиперметилование промоторной области *GLCE*, структуру хроматина в зоне промотора гена *GLCE*, участие специфических транскрипционных факторов (TCF4/ β -катенин) и пост-транскрипционную регуляцию за счет микроРНК-2018. Регуляция экспрессии в различных тканях человека носит тканеспецифичный характер.
5. Д-глюкуронил С5-эпимераза является опухоль-супрессирующим геном. Экспериментальное повышение уровня экспрессии *GLCE* подавляет пролиферативную активность опухолевых клеток мелкоклеточного рака легкого *in vitro* и формирование экспериментальных опухолей *in vivo*, что может быть положено в основу создания нового таргетного антиопухолевого препарата для лечения этого типа опухолей.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты работы были представлены и обсуждены на Мировом конгрессе по онкологии и Симпозиуме по молекулярной медицине (The World Congress on Advances in Oncology, and International Symposium on Molecular Medicine) (Крит, Греция, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2012; Родос, Греция, 2011; Афины, Греция, 2014, 2015, 2016, 2017), на 6^{ой} Европейской конференции по раку молочной железы (6th European Breast Cancer Conference, Берлин, Германия, 2008), на 8^{ой} Международной конференции по исследованию рака (8th International Conference of Anticancer Research, Кос, Греция, 2008), на 6 Международной конференции по протеогликанам (6th International Conference on Proteoglycan, Aix-les-Bains, France, 2009), на 1 Британской конференции по изучению рака молочной железы (1st British Breast Cancer Research Conference, Nottingham, UK, 2010), на Всероссийской конференции молодых ученых-онкологов «Актуальные вопросы

экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, Россия, 2004, 2010, 2013, 2014, 2015); на 8 Европейской конференции по раку молочной железы (8th European Breast Cancer Conference (EBCC), Vienna, AUSTRIA, 2012); на Конгрессах Федерации Европейских Биохимических обществ (FEBS Congress, Санкт-Петербург, 2013; FEBS Congress, Париж, Франция, 2014), на II Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология» (Саратов, Россия, 2014), Рабочем совещании Европейского общества молекулярной биологии "Клеточные и молекулярные механизмы взаимодействия опухоли с микроокружением (EMBO Workshop "Cellular and molecular mechanism of tumour–microenvironment crosstalk", Томск, Россия), V Съезде физиологов СНГ и V Съезде биохимиков России (Сочи, Россия, 2016), Российском онкологическом конгрессе (Москва, Россия, 2015, 2016, 2017), Конференции по протеогликанам (7 Lakes Proteoglycans Conference, Varese, Italy, 2017).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 25 статей в рецензируемых журналах и 25 тезисов в международных журналах.

Вклад автора

Все основные результаты, вошедшие в диссертацию, получены автором лично или под его руководством. Автор лично осуществлял дизайн данного исследования, организацию и координацию экспериментальной работы, проводил анализ полученных результатов и их подготовку к публикации. Все выводы и теоретические обобщения сделаны автором самостоятельно.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из 5 глав: "Обзор литературы", "Материалы и методы", "Система биосинтеза гепарансульфата в нормальных тканях человека и при их злокачественной трансформации", "Роль Д-глюкуронил С5-эпимеразы в канцерогенезе", "Обсуждение результатов". Главы с 3 по 4 описывают результаты собственных исследований по двум основным направлениям исследования - изучение системы биосинтеза гепарансульфата в нормальных и опухолевых тканях человека и изучение роли Д-глюкуронил С5-эпимеразы в канцерогенезе.

Объем диссертации составляет 200 машинописных страниц, включая 100 рисунков и 19 таблиц. Список литературы содержит 211 ссылок.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 "Организация и функционирование системы биосинтеза гепарансульфата (обзор литературы)" содержит необходимую информацию о структуре и свойствах сложных белково-углеводных молекул протеогликанов (ПГ), их локализации в клетках и тканях человека и функциональной роли в нормальной физиологии и канцерогенезе. Детально охарактеризованы структура и свойства углеводных цепей гепарансульфата (ГС), ферментативная система биосинтеза ГС и ее структурная организация. Представлены известные данные о вовлеченности гепарансульфата и его биосинтетической системы в процесс злокачественной трансформации, сделан акцент на малоизученных аспектах в этой области исследований. Наиболее подробно описан один из ключевых ферментов

биосинтеза ГС - Д-глюкуронил С5-эпимераза, ответственная за пост-синтетическую модификацию структуры углеводных цепей гепарансульфата, которая придает ГС более гибкую структуру и способность к взаимодействию с многочисленными лигандами, включая факторы роста и молекулы межклеточных контактов. Приведена вся имеющаяся информация по структурной организации гена Д-глюкуронил С5-эпимеразы (*GLCE*), регуляции ее экспрессии и роли в физиологических процессах. Описаны недостаточно изученные моменты и возможные направления дальнейших исследований в этой области.

Глава 2 "Материалы и методы"

Клинические образцы. В работе использовали образцы злокачественных и доброкачественных опухолей молочной железы человека (ГКБ N1 г. Новосибирска), опухолей прямой кишки человека (Национальный Институт Онкологических Исследований, г. Киев, Украина), опухолевую и гиперплазированную ткани предстательной железы человека (ОКБ и ГКБ N1 г. Новосибирска; Университет Крита, Лаборатория Клинической Вирусологии, Греция), образцы глиальных опухолей головного мозга человека (НИИПК им. Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск).

Выделение РНК. Выделение общей РНК проводили с помощью PureLink Total RNA Purification System или реагента TRIzol (ThermoFisher Scientific, США). Обработку РНК от возможной примеси геномной ДНК проводили при помощи набора реагентов TURBO DNA-free (Ambion inc., Великобритания). Измерение концентрации суммарной РНК, ДНК и белка производили при помощи Qubit флуориметра и набора реактивов Qubit-iT RNA Assays Kit, Qubit-iT br DNA Assays Kit и Qubit-iT Protein Assays Kit (ThermoFisher Scientific, США).

ОТ-ПЦР анализ. Для обратной транскрипции РНК использовали набор реагентов First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas, США). Уровень экспрессии генов определяли методами мультиплексной ПЦР (Терцик, "ДНК Технологии", Россия), полуколичественной ПЦР в реальном времени или количественной ПЦР в реальном времени (Custom GLCE TaqMan Assay, Applied Biosystems, США) на приборах BioRad CFX-96 или IQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (BioRad, США).

Уровень экспрессии микроРНК-218 определяли методом ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan Micro RNA assay (Invitrogen, США).

Выделение геномной ДНК проводили с помощью E.Z.N.A. DNA isolation kit (Zymo Research, USA).

Определение статуса метилирования промотора. Для оценки статуса метилирования промоторной области использовали методы метил-специфичной ПЦР и бисульфитного секвенирования (TOPO TA Cloning Kit for Sequencing, Invitrogen BV, Нидерланды; Zippy Plasmid Miniprep Kit, Zymo Research Corporation, США; BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit v1.1 и ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, США). Бисульфитную обработку геномной ДНК проводили с помощью MethylCode Bisulfite Conversion Kit (Invitrogen, США).

Иммунопреципитация хроматина (ChIP Assay). Для ChIP Assay использовали набор реагентов MAGnify Chromatin Immunoprecipitation System (Invitrogen, США) и антитела к

модифицированным гистонам H3K9Ac, H3K9Me3 или H3K4Me3 (Abcam, Великобритания).

Культивирование клеток *in vitro*. Культуры TERT-иммортизированных фибробластов человека (BjTERT), клеток рака молочной железы (MCF7), немелкоклеточного (A549, H157, H647) и мелкоклеточного рака легкого (U2020), рака почки (KRC/Y), рака прямой кишки (HCT116, AG2), глиобластомы (U87) и рака предстательной железы (PC3, DU145, LNCaP) человека были получены в Каролинском институте (Стокгольм, Швеция). Нормальные клетки предстательной железы человека (PNT2) были получены из Европейской коллекции клеточных культур (ECACC, Salisbury, Великобритания).

Клонирование гена Д-глюкуронил C5-эпимеразы (GLCE). Клонирование GLCE проводили в эписомальный вектор pETE/BSD с последующим переклонированием в вектор pCER4 (Invitrogen, США) на основе клона KIAA0836 (AB_020643), кодирующего 5'-укороченную последовательность GLCE (Kazusa DNA Research Institute, Япония).

Определение уровня клеточной пролиферации *in vitro*. Степень клеточной пролиферации определяли с использованием теста на формирование колоний и при помощи набора реагентов CyQUANT NF Cell Proliferation Assay (Invitrogen, США).

Иммунофлуоресцентное окрашивание и иммуногистохимический анализ проводили при помощи системы ImmunoPure Ultra-Sensitive ABC Standard Peroxidase Staining Kit (Pierce, США) или Histostain-Plus 3rd Gen IHC Detection Kit («ThermoFisher Scientific», США). Первичные антитела - rabbit anti-human GLCE (GenScript Corporation, США) или mouse anti-human GAPDH (Abcam, Великобритания).

Влияние GLCE на рост экспериментальных опухолей *in vivo*. Способности к формированию опухолей *in vivo* определяли методом инокуляции изучаемых клеток иммунодефицитным мышам линии SCID (Каролинский Институт, Стокгольм, Швеция).

Молекулярные механизмы функциональных эффектов Д-глюкуронил C5-эпимеразы определяли с использованием наборов реактивов Cancer PathFinder RT2 Profiler™ PCR Array и Wnt Signaling Pathway RT2 Profiler™ PCR Array (SABioscience, США) и iCycler iQ5 Multicolor Detection System (Bio-Rad, США). Полученные результаты анализировали программой Excel-based PCR Array Data Analysis Software (SABioscience, США).

Статистическая обработка результатов. Статистическая обработка результатов проводилась при помощи программ STATISTICA 6.0. и ORIGIN Pro 8.1. Результаты представляли в виде средней величины и стандартной ошибки среднего (среднее±SD). Достоверность отличий между двумя выборками оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Отличия между выборками считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

Глава 3 "Система биосинтеза ГС в нормальных тканях человека и при их злокачественной трансформации"

В данной работе объединены два аспекта изучения системы биосинтеза ГС – понимание, как она работает, собственно, как единый функциональный механизм и более детальное исследование отдельных представителей этой системы.

В рамках первого из них был проведен сравнительный анализ паттернов экспрессии и транскрипционной активности основных генов биосинтеза ГС (*EXT1/EXT2*, *NDST1/2*,

GLCE, *2OST1/HS2ST1*, *3OST1/2/HS3ST1/2*, *6OST1/2/HS6ST1/2*, *SULF1/2*, *HPSE*) в различных нормальных и опухолевых клетках и тканях человека: рак молочной железы, рак предстательной железы, рак прямой кишки и глиальные опухоли головного мозга. Уровень экспрессии и транскрипционный паттерн изучаемых генов определяли методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Для качественной оценки способности различных клеток экспрессировать необходимый набор генов биосинтеза ГС был предложен новый параметр, представляющий собой совокупность уровней экспрессии всех исследуемых генов, условный размер которого может быть интерпретирован как общая транскрипционная активность системы биосинтеза ГС в конкретной клетке или ткани, а характерное соотношение уровней экспрессии различных генов - как паттерн их экспрессии (Рисунок 1).

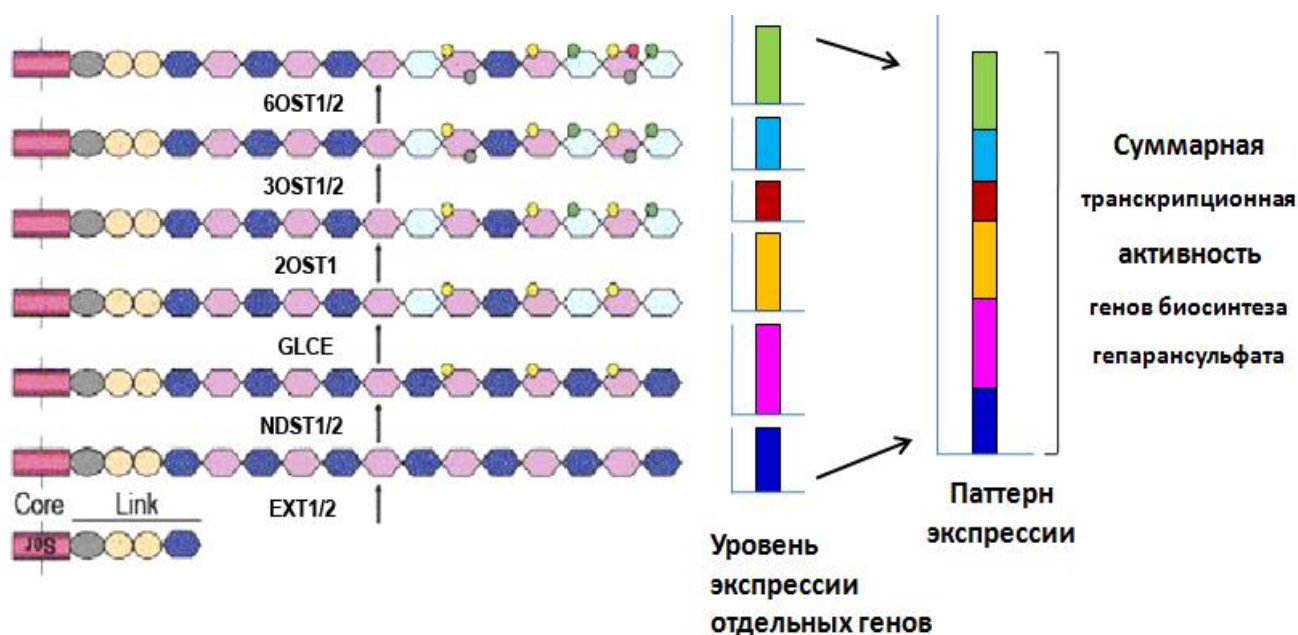


Рисунок 1. Схема представления данных по определению суммарной транскрипционной активности генов системы биосинтеза гепарансульфата в нормальных и опухолевых клетках и тканях. Слева – схема биосинтеза ГС.

Такой подход позволяет провести качественную и полуколичественную оценку способности клетки одинаково эффективно экспрессировать все гены, белковые продукты которых необходимы для создания комплекса ферментов, функционирующих как единая система биосинтеза гепарансульфата. Данная стратегия интерпретации полученных результатов была использована при изучении экспрессии генов, кодирующих различные ферменты биосинтеза ГС во всех изучаемых типах опухолей (прямой кишки, молочной и предстательной желез, опухолей головного мозга человека).

Рак молочной железы

В опухолях молочной железы не происходит очевидных изменений транскрипционного паттерна и уровня экспрессии генов метаболизма ГСПГ (*EXT1/EXT2*, *NDST1/2*, *GLCE*, *OST1/2*, *SULF1/2*, *HPSE*) по сравнению с нормальной тканью молочной железы. Однако экспрессия некоторых из ключевых коровых белков протеогликанов (синдекан-1/*SDC1*, глипикан-1/*GPC1*, перлекан/*HSPG2*, декорин/*DCN*, бигликан/*BGN*, версикан/*VCAN*, агрекан/*ACAN*, серглицин/*SRGN*, *NG2/CSPG4*, бревикан/*BCAN*, люмикан/*LUM*, *CD44*)

значительно изменяется в таких опухолях по сравнению с окружающей нормальной тканью (экспрессия синдекана-1 увеличивается, декорина и люмикана снижается, а агрекана остается неизменной, что приводит к изменению паттерна экспрессии ПГ в опухолях молочной железы). Полученные результаты позволяют сделать вывод, что в опухолях молочной железы человека происходят изменения на уровне экспрессии коровых белков протеогликанов, в то время как система биосинтеза углеводных цепей гепарансульфата остается практически неизменной.

Рак прямой кишки

Уровень транскрипционной активности генов системы биосинтеза ГС в опухолях прямой кишки не изменяется по сравнению с таковым в нормальной ткани, но происходит изменение паттерна их экспрессии, связанное с усилением экспрессии сульфатаз (SULF1, SULF2) в опухоль-ассоциированной строме, которые ответственны за внеклеточное десульфатирование ГС по 6-положению. Транскрипционная активность коровых белков протеогликанов была сопоставима в нормальных и опухолевых тканях прямой кишки, однако в опухолях происходит заметное изменение паттерна экспрессии коровых белков основных ПГ (снижение экспрессии декорина и перлекана и повышение экспрессии бигликана и версикана). При этом экспрессия декорина и бигликана практически отсутствует в клеточных линиях рака прямой кишки, а версикан избирательно экспрессируется только в клетках HCT116, но не в стволовых клетках рака прямой кишки AG2. Это позволяет предположить, что основным источником бигликана и версикана в опухолях прямой кишки являются опухоль-ассоциированные фибробласты стромы. В целом, полученные данные говорят о том, что при раке прямой кишки не происходит ни заметного изменения общей способности ткани экспрессировать коровые белки протеогликанов, ни количественных изменений в транскрипционной активности системы биосинтеза углеводных цепей ГС. Однако набор экспрессируемых коровых белков меняется за счет активации опухоль-ассоциированных фибробластов, а цепи ГС могут подвергаться более интенсивному десульфатированию за счет внеклеточных сульфатаз.

Рак предстательной железы

Общая активность системы биосинтеза гепарансульфата в патологических тканях предстательной железы человека (опухолевая ткань и доброкачественная гиперплазия) снижена в 2-3 раза по сравнению с нормальной тканью. В опухолях происходит также изменение транскрипционного паттерна ферментов метаболизма ГС за счет дисбаланса генов, ответственных за синтез (EXT1 и EXT2) и пост-синтетическую модификацию углеводных цепей ГС (NDST1/2, GLCE, OST1/2, SULF1/2) (Рисунок 2).

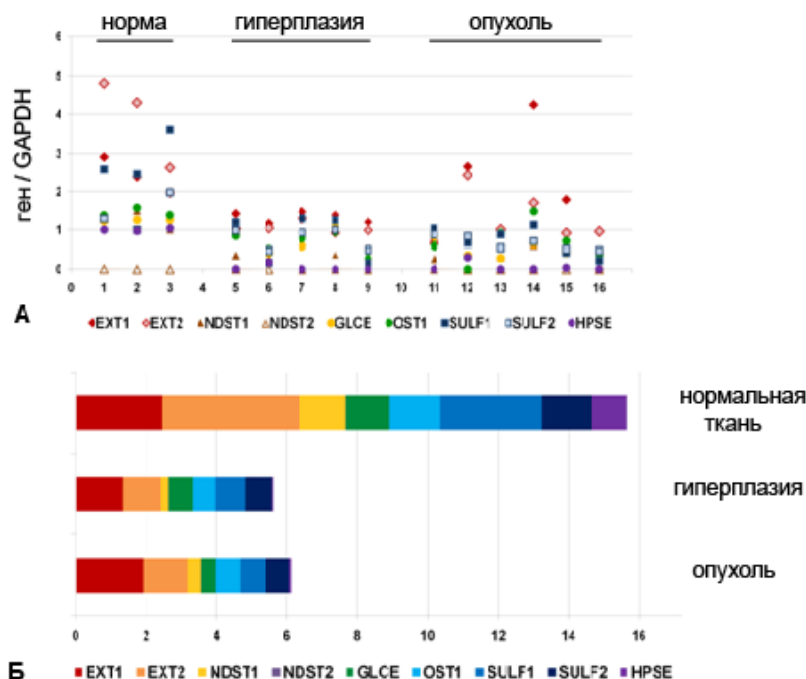


Рисунок 2. Активность системы метаболизма гепарансульфатов в нормальной, гиперплазированной и опухолевой тканях предстательной железы человека. **А.** Транскрипционная активность ключевых генов метаболизма ГС. 1-16 - пациенты. **Б.** Сравнительный анализ общей активности системы метаболизма ГС в нормальных и патологических тканях предстательной железы человека.

Эти данные позволяют предположить, что в опухолевой ткани может происходить не только снижение биосинтеза ГС, но и не полная их модификация, приводящая к появлению на поверхности клеток ГСПГ с незрелыми углеводными цепями ГС. Иммунофлуоресцентный анализ локализации углеводных цепей гепарансульфатов в нормальной и патологической ткани предстательной железы подтвердил, что в опухолях происходит не только изменение уровней экспрессии генов ферментов биосинтеза ГС, но и нарушение внутриопухолевой локализации синтезируемых ими углеводных молекул гепарансульфата.

Выявленная в опухолях высокая степень внутриопухолевой гетерогенности по содержанию ГС (по сравнению с нормальной тканью предстательной железы человека) свидетельствует о вероятном присутствии нескольких подтипов опухолевых клеток, обладающих различной активностью системы биосинтеза ГС. Действительно, паттерны экспрессии генов, вовлеченных в метаболизм ГС, в нормальных эпителиальных клетках предстательной железы (PNT2) и опухолевых клетках предстательной железы (LNCaP, PC3, DU145) заметно различаются между собой, а общая транскрипционная активность системы в опухолевых клетках может быть сопоставима (PC3), ниже (LNCaP) или выше (DU145) таковой в нормальных клетках PNT2. Эти количественные изменения в общей транскрипционной активности системы сопровождаются качественными изменениями паттернов экспрессии генов биосинтеза ГС, при которых происходит изменение соотношения активностей ГС-синтезирующих (EXT1/2) и модифицирующих (NDST1/2, GLCE, OST1, SULF1/2) ферментов.

Глиомы

В глиомах человека различной степени злокачественности (анапластическая астроцитома, олигоастроцитома, градация II-III; мультиформная глиобластома градация IV) также была выявлена тенденция к снижению среднего уровня транскрипционной активности биосинтетической системы в 1,5-3 раза по сравнению с околоопухолевой тканью мозга (Рисунок 3).

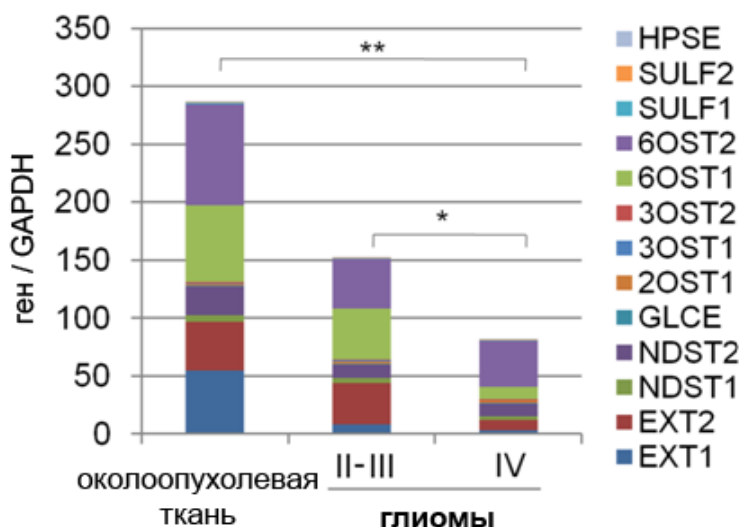


Рисунок 3. Экспрессия генов ферментов системы биосинтеза ГС в глиомах различных градаций. Интенсивность амплифицированных фрагментов ДНК нормирована на таковую для *GAPDH*. Условные столбцы отражают вклад каждого гена в общий суммарный уровень экспрессии. Control - paratumotous brain tissue. * - $p < 0.01$; ** - $p < 0.05$.

Наиболее значительный вклад в общее снижение активности этой системы вносило подавление экспрессии генов, ответственных за биосинтез ГС цепи (экзостозил-трансферазы EXT1 и EXT2) и ее сульфатирование по 6О-положению (6О-сульфотрансферазы 6OST1 и 6OST2). Интересно, что при этом содержание ГС в тканях глиом не только не снижалось, а даже увеличивалось в 50-55% образцов глиобластом и характеризовалось высокой внутриопухолевой гетерогенностью. Повышенное содержание ГС в опухолевых клетках глиобластомы не было ассоциировано с их пролиферативной активностью (Ki67 индекс). Однако безрецидивная выживаемость пациентов с высоким уровнем ГС в опухоли была ниже, чем у пациентов с низким уровнем ГС, а в образцах рецидивов глиобластом содержание ГС было значительно выше, чем в образцах впервые обнаруженных опухолей от тех же пациентов (Рисунок 4).

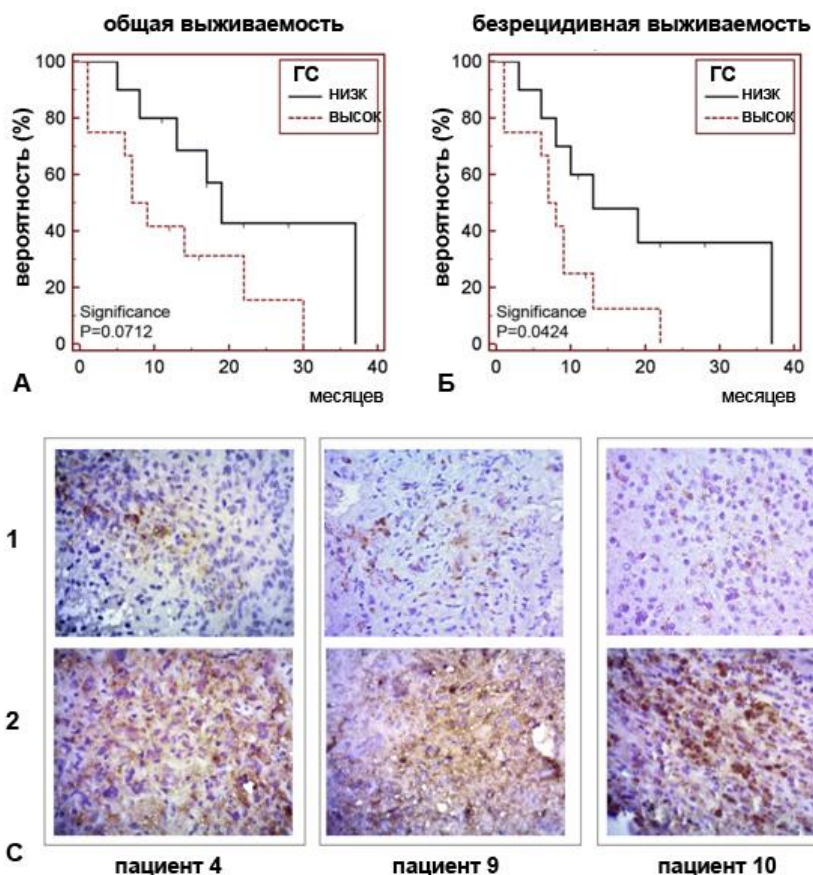


Рисунок 4. Анализ выживаемости Каплана-Мейера для пациентов с высоким и низким содержанием ГС в опухолях. **А.** Общая выживаемость. **Б.** Безрецидивная выживаемость. **В.** Сравнительный анализ экспрессии ГС в образцах первичных и рецидивирующих опухолей, полученных от одного пациента. 1 - первая операция, 2 - повторная операция (рецидив). Ув. *400.

Повышение содержания ГС в тканях глиобластом было ассоциировано с повышением уровня экспрессии коровых белков ГСПГ синдекана-1 (в 2,5-3 раза), глипикана-1 (в 2,5 раза) и перлекана (в 16 раз), однако только для перлекана это увеличение было статистически значимо ассоциировано с выживаемостью пациентов согласно анализу Каплан-Мейера ($p=0,0243$).

Сравнительный анализ системы биосинтеза ГС в различных опухолях человека

Сравнительный анализ системы биосинтеза ГС выявил относительно сбалансированный транскрипционный паттерн экспрессии генов биосинтеза ГС в нормальных тканях прямой кишки, молочной и предстательной желез человека *in vivo*. Однако в опухолях происходят тканеспецифические изменения системы биосинтеза ГС, заключающиеся в значительном подавлении экспрессии этой системы в опухолях предстательной железы и ее активации в опухолях прямой кишки (в первую очередь за счет усиления экспрессии сульфатаз SULF1 и SULF2). В то же время, никаких изменений в общей транскрипционной активности системы биосинтеза ГС не было показано в опухолях молочной железы по сравнению с нормальной тканью.

В целом, различные виды рака (молочной и предстательной желез, прямой кишки) характеризуются различным уровнем транскрипционной активности и паттернами экспрессии системы биосинтеза ГС (Рисунок 5).

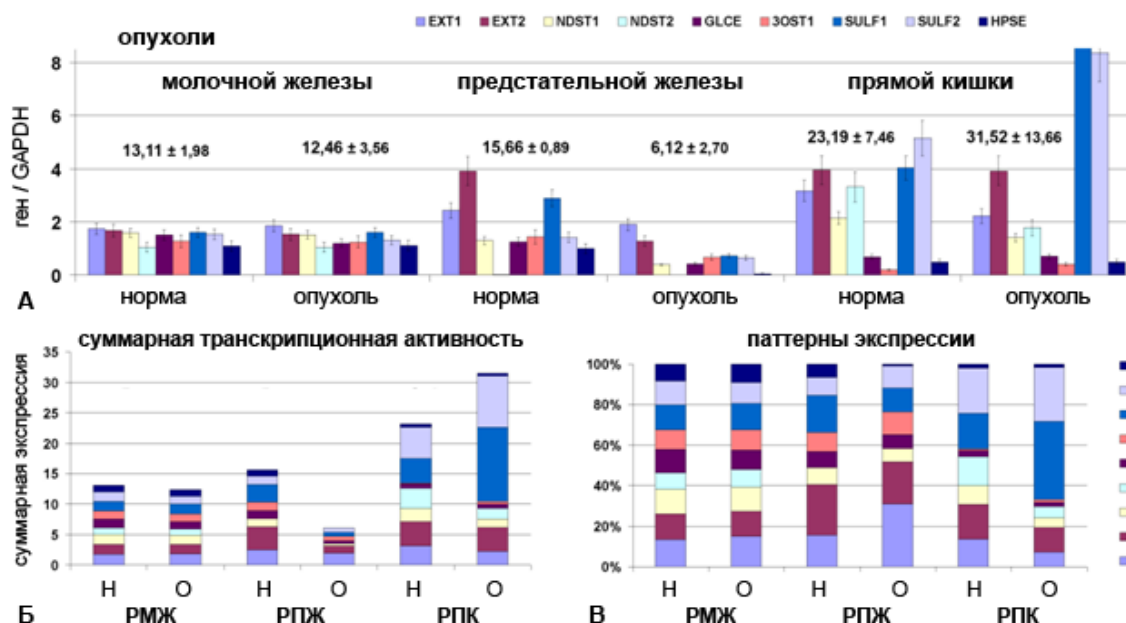


Рисунок 5. Тканеспецифичность системы биосинтеза ГС в различных опухолях человека. **А.** Экспрессия генов, вовлеченных в биосинтез ГС в нормальных и опухолевых тканях молочной и предстательной желез, прямой кишки. Показано отношение уровня экспрессии генов к экспрессии *GAPDH* (OriginPro 8.1). **Б.** Общая транскрипционная активность ключевых генов метаболизма ГС в различных тканях. **В.** Паттерны транскрипции системы метаболизма ГС, показан относительный вклад каждого гена в общую активность системы, принятую за 100%.

Выявленная в опухолях гетерогенность изменений системы биосинтеза ГС в полной мере проявляется и при анализе клеточных линий различного морфологического происхождения (молочная и предстательная железы, прямая кишка, почка, мелко- и немелкоклеточный рак легкого, мозг) *in vitro*. Общая транскрипционная активность генов биосинтеза ГС была индивидуальна для каждой клеточной линии, с 3-кратной разницей между наиболее и наименее активно экспрессирующими линиями и общей тенденцией к снижению активности системы в опухолевых клетках (Рисунок 6).

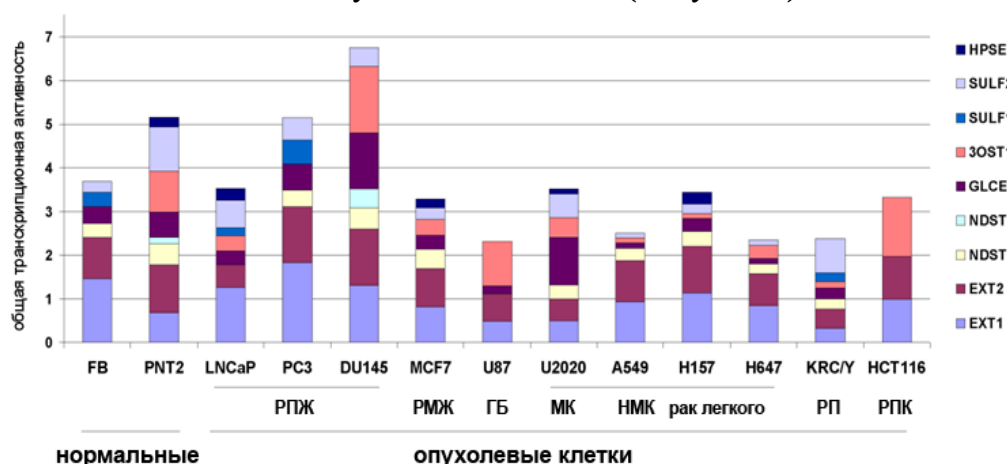


Рисунок 6. Транскрипционная активность системы метаболизма гепарансульфатов в различных нормальных и опухолевых клеточных линиях *in vitro*. Для каждого гена определено отношение уровня его экспрессии к экспрессии *GAPDH* (OriginPro 8.1).

Наряду с этим также можно увидеть определенную тканеспецифичность уровня экспрессии системы биосинтеза ГС в клеточных линиях одинакового происхождения - так, средний уровень экспрессии системы в клеточных линиях рака предстательной железы (5.1 ± 2.3) почти в 2 раза превышает таковой в клетках рака легкого (3.00 ± 1.37).

В целом, полученные данные показывают, что нормальные клетки различного морфологического происхождения обладают специфическим уровнем активности и паттерном экспрессии системы биосинтеза гепарансульфата. В опухолевых клетках происходит снижение общей транскрипционной активности и изменение паттерна экспрессии системы биосинтеза ГС, специфичное для каждого типа клеток. В опухолевых тканях изменения в экспрессии коровых белков протеогликанов и системы биосинтеза их углеводных цепей происходят не только в клетках, но и в опухоль-ассоциированной строме, что приводит к появлению тканеспецифичных паттернов экспрессии системы биосинтеза ГС в эпителиальных опухолях молочной и предстательной желез человека, рака прямой кишки и глиальных опухолях головного мозга.

Несмотря на то, что этот блок исследований позволяет получить новые знания об организации и системы биосинтеза гепарансульфата, он не позволяет провести их экспериментальную проверку. В качестве возможного непрямого подхода к решению этой проблемы может быть детальное исследование молекулярных механизмов регуляции одного из ключевых компонентов этой системы. На момент начала данного исследования самым неизученным ферментом оставалась Д-глюкуронил С5-эпимераза - поэтому было принято решение провести ее детальное изучение и потенциальную вовлеченность в процессы канцерогенеза.

Глава 4 "Роль Д-глюкуронил С5-эпимеразы в канцерогенезе"

Д-глюкуронил С5-эпимераза (*GLCE*, NM_015554.1) является одним из ключевых ферментов биосинтеза ГС, который проводит эпимеризацию уроновой кислоты в составе углеводных цепей ГС. Помимо изменения конформации и 3-мерной структуры цепей ГС, эта модификация является необходимым условием сульфатирования ГС по 2-положению, и таким образом оказывает значительное влияние на конечную структуру и функциональную активность синтезированных цепей ГС, которые играют важную роль в поддержании межклеточных взаимодействий.

Экспрессия Д-глюкуронил С5-эпимеразы в нормальных и опухолевых тканях

Оценка уровня экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы в различных тканях человека была проведена методом мультиплексной ОТ-ПЦР с использованием кДНК из различных тканей (Multiple cDNA Panel, Clontech, США) и показано, что наивысшая экспрессия *GLCE* определяется в тканях молочной железы и легкого, с меньшей экспрессией в тканях почки, тимуса и щитовидной железы человека. Этот результат имеет самостоятельное значение, так как в литературе есть лишь противоречивые данные по тканеспецифичности экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы человека, представленные в базах данных SAGE, Electronic Northern и Microarray expression data (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GLCE&search=GLCE>). Также он обусловил выбор типов опухолей для дальнейшей работы - молочная железа и легкое были выбраны как ткани с наиболее высокой базовой экспрессией гена Д-глюкуронил С5-эпимеразы. Дополнительно в

исследование была включена предстательная железа, как гормон-зависимая ткань, наиболее близкая по функциональным особенностям ткани молочной железы человека.

Рак молочной железы. Для сравнительного анализа экспрессии гена *GLCE* в тканях молочной железы человека были использованы нормальная ткань молочной железы, контрольная и опухолевая ткани (центральная часть опухоли и максимально удаленный образец неизмененной ткани железы одного и того же пациента). Методом мультиплексной ОТ-ПЦР и количественной TaqMan ОТ-ПЦР в реальном времени (Custom TaqMan Assay, Applied Biosystems, США) было показано, что экспрессия Д-глюкуронил С5-эпимеразы значительно снижена у 82% исследованных пациентов (более чем в 2-2,5 раза) по сравнению с таковой в нормальной ткани молочной железы человека (1000-2000 молекул (на 1000 молекул актина). Более того, в большинстве случаев было отмечено снижение экспрессии *GLCE* по сравнению с нормой (не больше 387-396 молекул/1000 молекул актина) не только в опухоли, но и в прилежащей контрольной ткани, и в доброкачественных опухолях молочной железы. В 20% случаев доброкачественных новообразований (фиброаденома молочной железы) экспрессия Д-глюкуронил С5-эпимеразы полностью отсутствовала ($p < 0.01$), тогда как в 17 образцах ее уровень был сопоставим с нормой (1000-2000 молекул/1000 молекул актина). Снижение уровня экспрессии *GLCE* в 84% опухолей молочной железы было подтверждено также на уровне ее белковой молекулы методом Вестерн-блоттинга, хотя белок Д-глюкуронил С5-эпимеразы (68кДа) выявляется в контрольной ткани всех пациентов и во всех образцах фиброаденомы молочной железы.

Таким образом, полученные данные показали, что в 82-84% опухолей молочной железы человека уровень экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы снижен более чем в 2 раза по сравнению с нормальной тканью ($p < 0.0001$) как на транскрипционном, так и на трансляционном уровне. Снижение экспрессии показано также в 77% образцов контрольной ткани ($p < 0.0001$) и 20% фиброаденом молочной железы ($p < 0.01$).

Рак предстательной железы. Определение уровней экспрессии *GLCE* в нормальных и патологических тканях предстательной железы человека проводили теми же методами, что и для тканей молочной железы - мультиплексной (нормализация на *GAPDH*) и количественной ОТ-ПЦР в реальном времени (нормализация на *бета-актин*). В нормальной ткани ген Д-глюкуронил С5-эпимеразы экспрессируется на уровне 600-700 молекул/1000 молекул актина и 93% пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы имели сходный или даже повышенный уровень экспрессии *GLCE* (соотношение *GLCE*/b-actin $1,92 \pm 1,04$). Однако уровень экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы был значительно снижен у 46% пациентов с злокачественными опухолями (от 20 до 250 молекул *GLCE*/1000 молекул актина), в то время как остальные 54% образцов имели уровень экспрессии, сопоставимый с нормой либо выше нормального.

Данные иммуногистохимического анализа экспрессии белковой молекулы *GLCE* хорошо согласуются с результатами молекулярного анализа – экспрессия выявляется в большинстве образцов гиперплазии и доброкачественных поражений предстательной железы, и приблизительно в половине случаев рака (Рисунок 7).

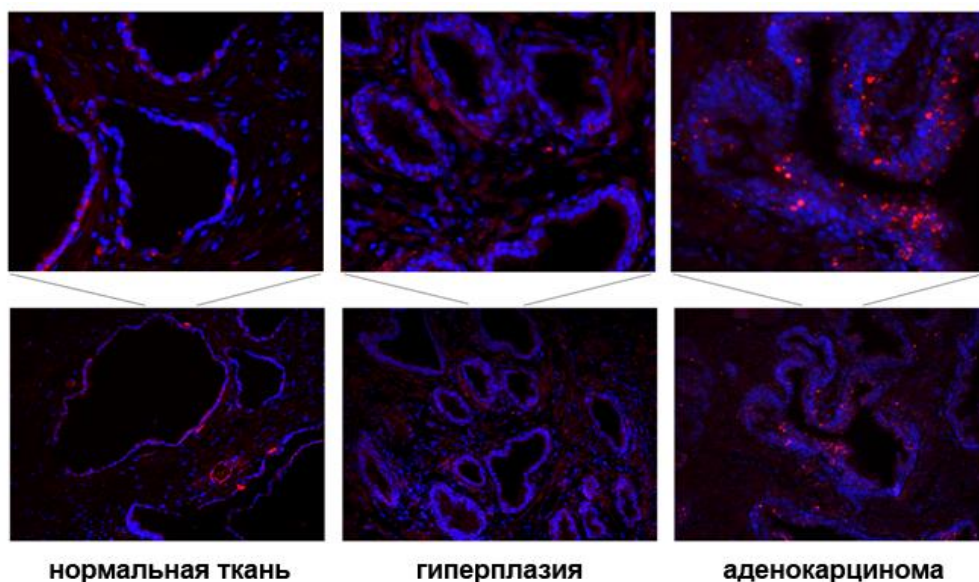


Рисунок 7. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии GLCE в патологических тканях предстательной железы человека. Нижняя панель – увеличение *200; верхняя панель – увеличенные изображения (*400) областей с наиболее гетерогенной экспрессией GLCE. Первичные анти-GLCE антитела визуализированы при помощи вторичных антител, конъюгированных с TexasRed (красный). Синий цвет – DAPI (ядра клеток).

Кроме того, в опухолевых тканях предстательной железы происходят изменения в паттернах локализации GLCE, связанные с появлением GLCE-позитивных и GLCE-негативных клеток и высокой внутриопухолевой гетерогенностью изучаемых опухолей по этому параметру. Согласно полученным результатам, снижение экспрессии GLCE в опухолях предстательной железы человека происходит как на уровне мРНК, так и на уровне ее белковой молекулы.

Таким образом, было показано, что уровень экспрессии гена Д-глюкуронил С5-эпимеразы снижается в опухолях молочной и предстательной желез человека. По-видимому, *GLCE* каким-то образом вовлечен в процесс злокачественной трансформации, клеток и тканей и снижение экспрессии или активности этого фермента играют значительную функциональную роль в индукции опухолевого роста.

Молекулярные механизмы регуляции Д-глюкуронил С5-эпимеразы

Для изучения молекулярных механизмов регуляции экспрессии *GLCE* были проведены эксперименты по ее возможной регуляции на генетическом (полиморфизмы) и/или на эпигенетическом уровнях (метилование промоторной области гена, влияние структуры хроматина или специфических микроРНК).

Регуляция *GLCE* на генетическом уровне

Для анализа вклада генетических механизмов регуляции экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы, структура этого гена была проанализирована в контексте существования полиморфных вариантов *GLCE* и их роли в определении функциональных характеристик данного гена. Компьютерный анализ общедоступных баз данных (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GLCE>) показал, что в гене эписотсутствуют 4505 одно-нуклеотидных полиморфизмов (Single-Nucleotide Polymorphism,

SNP), большинство из которых располагается в интронах и фактически не присутствует в человеческих популяциях (minor allele frequency (MAF) 0-0,1%). GLCE missense SNP rs3865014 (A>G, Val597Ile) был идентифицирован как единственный полиморфизм, заметно присутствующий в популяциях, несмотря на не-синонимичную замену аминокислоты в белке Д-глюкуронил С5-эпимеразы (Рисунок 8).

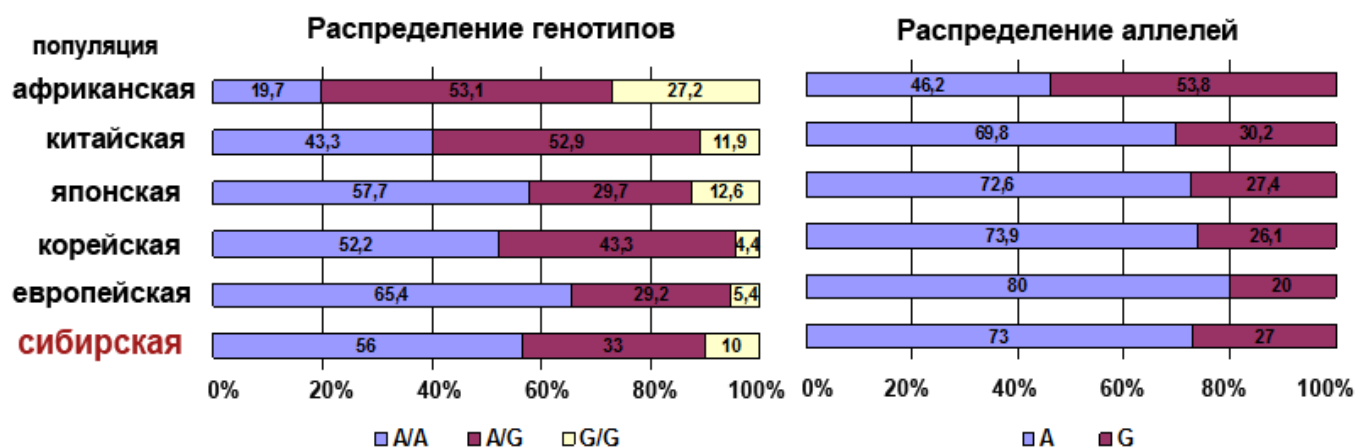


Рисунок 8. Распределение генотипов и аллелей однонуклеотидного полиморфизма GLCE rs3865014 в различных этнических популяциях. Данные представляют собой среднее для этнически схожих популяций, полученные в рамках различных проектов (dbSNP Short Genetic Variations database), дополненные нашими результатами по сибирской популяции.

Распределение GLCE rs3865014 SNP носит отчетливо выраженный популяционный характер, частота минорного аллеля G варьирует между 0,200-0,538 в различных популяциях (базы данных CSAgilent ClinSeq, NHLBI Exome Sequencing и HapMap Project). Распределение минорного аллеля GLCE rs3865014 (A>G) в популяции сибирских женщин европейского происхождения (n=136) (TaqMan-based SNP GLCE Array) составляет A0,73:G0,27, демонстрируя частоту минорного аллеля (27%) в 1,3 раза выше, чем в других популяциях европейского происхождения ($p=0.04$ OR=1.58 (1.15<OR<2.17)) и в 2 раза выше африканской популяции ($p=0.02$, OR=1.68 (1.06<OR<2.65)).

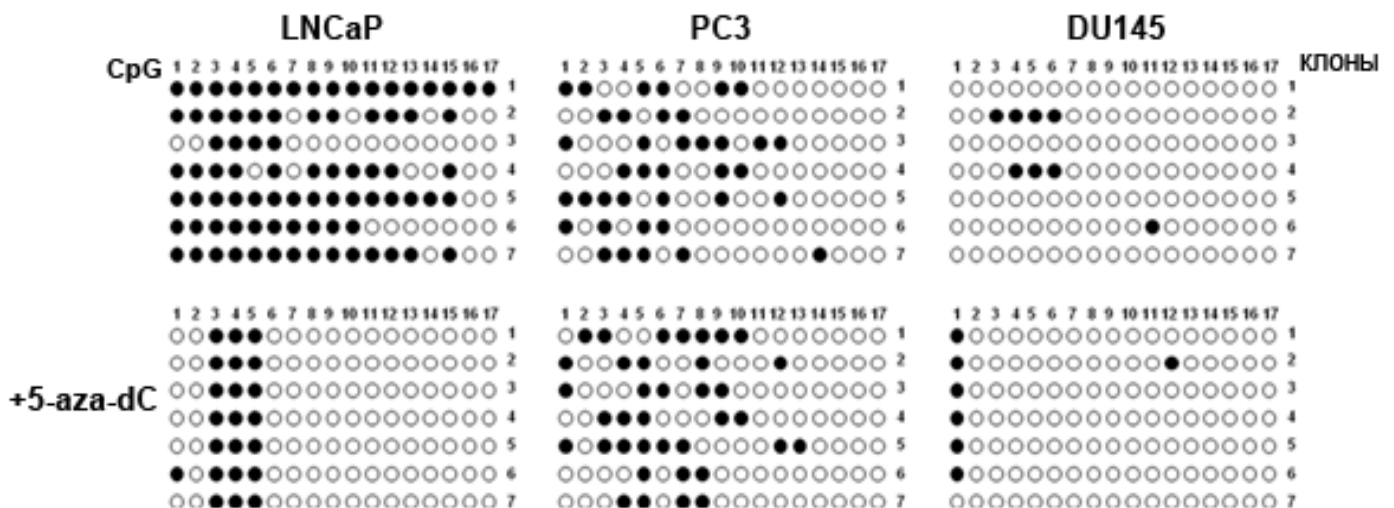
В то же время, распределение гетерозиготного генотипа AG среди сибирских женщин (33%) является наиболее близким к европейской и японской популяциям (29,2% и 29,7% соответственно). Встречаемость гетерозиготного генотипа AG была значительно повышена у пациентов с раком молочной железы (OR=1.76; 95% CI=1.04-1.90; $P(Y)=0.035$ $\chi^2=4.44$), что предполагает ассоциацию этого генотипа с повышенным риском рака молочной железы у женщин сибирской популяции. Также гетерозиготный генотип AG тесно ассоциирован с размером опухоли (T3-T4) (OR=3.67, $P(Y)=0.004$), эстроген-негативными (OR= 3.25, $P(Y)= 0.0028$) и трижды-негативными опухолями молочной железы (TNBC) (OR=4.94, $P(Y)=0.015$), являясь негативным фактором прогрессии заболевания. В то же самое время, гомозиготные GLCE генотипы (AA и GG) были более характерны для дважды позитивного (ER+PR+) люминального А рака (OR=0.25, 95%CI= 0.12-0.45, $P(Y)=0.031$) представляющего менее агрессивный подтип опухолей молочной железы человека.

Потеря гетерозиготности (loss-of-heterozygosity, LOH) GLCE rs3865014 была обнаружена приблизительно в 10% исследованных опухолей и была ассоциирована со снижением уровня экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы в соответствующих опухолевых тканях молочной железы.

В целом, представленные результаты говорят о том, что G аллель в гене *GLCE* обеспечивает более высокий уровень экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы в нормальной ткани молочной железы, но он же и ослабляет способность ткани молочной железы противостоять процессу канцерогенеза путем активации экспрессии *GLCE*. Полученные данные впервые показывают взаимосвязь полиморфизма *GLCE* rs3865014 (Val597Ile) с канцерогенезом и говорят о вкладе генетических механизмов в определение уровня экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы в ткани молочной железы человека.

Регуляция GLCE на эпигенетическом уровне

Согласно результатам метил-специфичной ПЦР и бисульфитного секвенирования, уровень метилирования CpG островков промоторной области *GLCE* в опухолях молочной железы человека не превышал 5-7%, каких-либо специфических сайтов метилирования выявлено не было. Отсутствие метилирования промотора *GLCE* было также показано для опухолевых клеток аденокарциномы молочной железы MCF7 и T47D и подтверждено обработкой этих клеток в культуре *in vitro* деметилирующим агентом 5-дезоксизацитидином (5-aza-dC).



Обработка всех линий клеток деметилирующим агентом 5-дезоксизацитидином (5-aza-dC) в культуре *in vitro* оказывала неоднозначное действие – практически не влияла на экспрессию *GLCE* в клетках PNT2 и DU145 и в 2-3 раза повышала экспрессию *GLCE* в клетках LNCaP и PC3. Бисульфитное секвенирование геномной ДНК до и после обработки клеток 5-aza-dC показало их явную гетерогенность в плане метилирования промотора *GLCE* (от 0% до 70%) и его чувствительности к обработке деметилирующим агентом.

Эти результаты дополняют данные, полученные для клинических образцов опухолей предстательной железы *in vivo* и позволяют высказать предположение, что дерегуляция экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы в различных клетках опухоли предстательной железы происходит за счет различных молекулярных механизмов (среди которых может быть и выборочное изменение степени метилирования промотора). Появляющиеся в результате этого популяции морфологически и функционально различных клеток могут вносить свой вклад в формирование высокой внутриопухолевой гетерогенности опухолей предстательной железы.

Таким образом, метилирование промоторной области Д-глюкуронил С5-эпимеразы скорее всего не является общим механизмом инактивации этого гена. Хотя оно и влияет на регуляцию экспрессии гена в некоторых клеточных линиях рака предстательной железы *in vitro* (в зависимости от их патоморфологических характеристик), однако, по-видимому, не вносит значительного вклада в регуляцию экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы в опухолевых тканях молочной и предстательной железы человека *in vivo*.

- **Структура хроматина**

Поскольку обработка клеток рака молочной железы MCF7 ингибитором гистоновых деацетилаз трихостатином А (TSA) (наряду с обработкой 5-аза-дезоксизацитидином) приводила к повышению уровня экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы в 2-3 раза по сравнению с контрольными клетками, нами было проверено предположение о влиянии структуры хроматина на уровень транскрипционной активности гена *GLCE*.

Вестерн-блот анализ клеточных лизатов с использованием антител против модифицированных гистоновых белков показал, что действие TSA и особенно 5-aza-dC/TSA на клетки MCF7 приводило к повышению количества модифицированных лизиновых остатков гистона H3 (H3K4Me3 и H3K9Ac), ассоциированных с активной формой хроматина, но не остатков H3K9Me3, являющихся маркером неактивного хроматина. Прямое взаимодействие регуляторной области гена *GLCE* с активированными гистоновыми белками определяли методом иммунопреципитации хроматина (ChIP) с использованием антител к H3K9Ac, H3K4Me3 и H3K9Me3. Обработка клеток 5-aza-dC/TSA приводила к усилению взаимодействия промоторной области *GLCE* с маркерами активного хроматина H3K9Ac и H3K4Me3, но практически не влияла на взаимодействие с маркером неактивного хроматина H3K9Me3 (Рисунок 10).

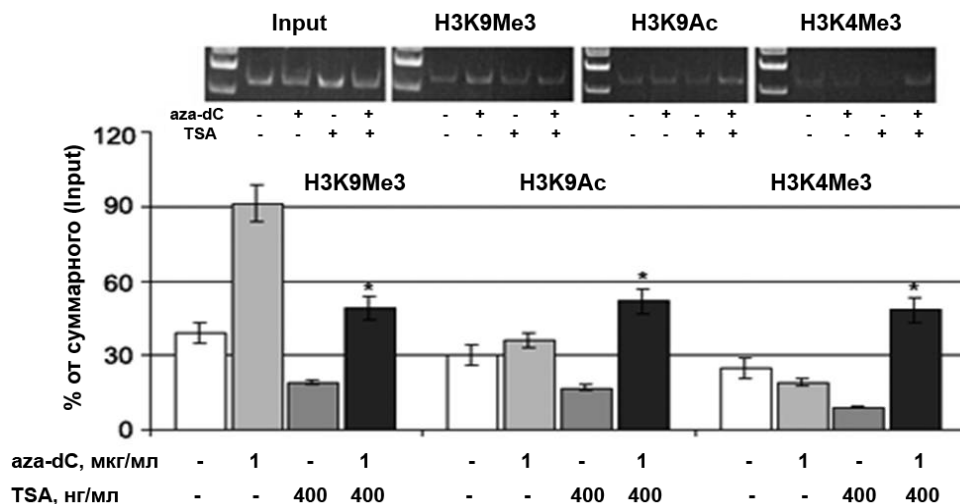


Рисунок 10. Взаимодействие промоторной области *GLCE* с модифицированными гистонами H3K9Me3, H3K9Ac и H3K4Me3 в клетках MCF7 до и после обработки 5-aza-dC и TSA (ChIP-assay). Верхняя панель - электрофореграмма ПЦР после хроматиновой иммунопреципитации. Количество иммуно-осажденной ДНК нормализовано на количество исходной ДНК. * $p < 0.05$ – достоверность между данными для MCF7 клеток до обработки и после обработки 5-aza-dC/TSA.

Таким образом, экспрессия гена Д-глюкуронил С5-эпимеразы зависит от структуры хроматина и модификаций гистонов в зоне промотора *GLCE* (ChIP-assay и Western-blot), а повышение степени ацетилирования гистонов (обработка клеток в культуре трихостатином А) приводит к усилению экспрессии *GLCE* в клетках карциномы молочной железы MCF7 и T47D. Эти результаты подтверждают возможность прямого влияния структуры хроматина на транскрипционную доступность промоторной области Д-глюкуронил С5-эпимеразы и уровень ее транскрипционной активности.

• Транскрипционные факторы

Помимо прямого участия в обеспечении доступности промоторной области *GLCE* для регулирующих ее транскрипционных факторов, структура хроматина может влиять на уровень экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы непрямым образом, через активацию других регуляторов экспрессии *GLCE* (например, факторов транскрипции). Одним из первых кандидатов на эту роль был Wnt/ β -катенин сигнальный механизм, который вовлечен в регуляцию экспрессии *GLCE* в клетках карциномы прямой кишки *in vitro* (Ghiselli *et al*, 2005). Для проверки этого предположения был использован Wnt Signaling Pathway PCR Array (SABioscience), позволяющий одновременно определять экспрессию 84 вовлеченных в этот механизм генов.

Суммарная оценка Wnt сигналинга в клетках карциномы молочной железы MCF7 выявила значительное подавление активности этого молекулярного механизма в клетках MCF7 после обработки их TSA (-0,73), в основном за счет инактивации канонического Wnt сигналинга (активация ингибиторов WNT AXIN, WIF1 и подавление экспрессии LRP5, MYC CCND1) (Рисунок 11).

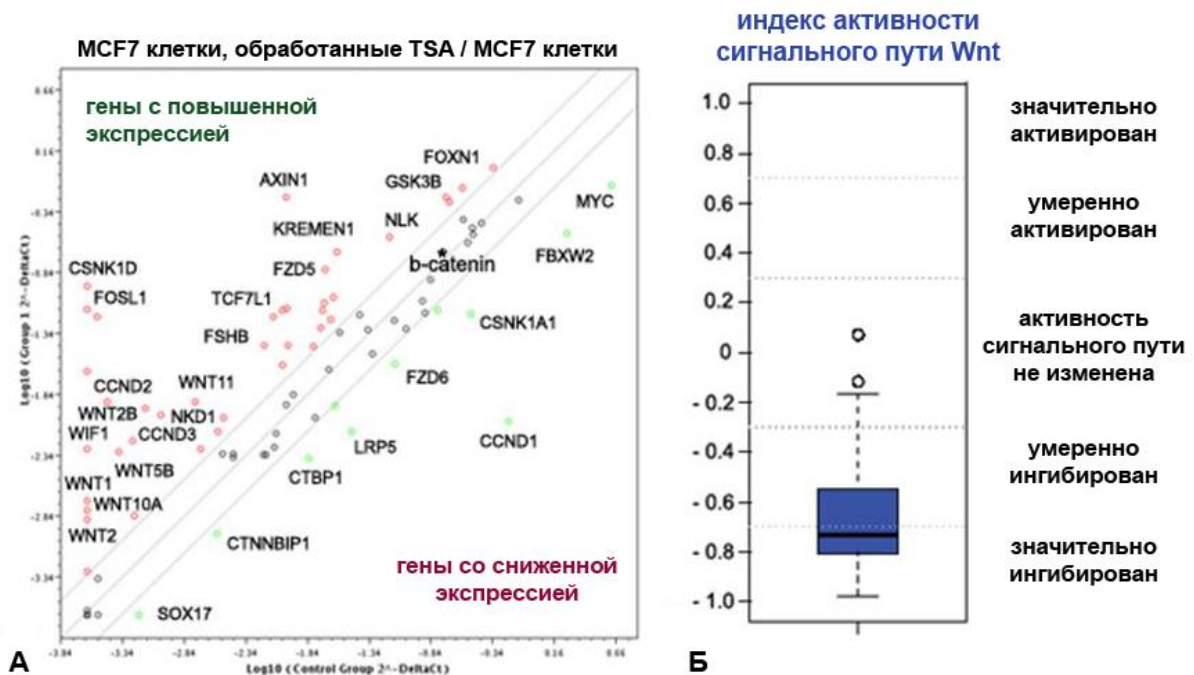


Рисунок 11. Подавление сигнального пути Wnt в клетках молочной железы MCF7, обработанных TSA. **А.** Изменение в экспрессии 84 генов, относящихся к сигнальному пути Wnt. Экспрессия генов в обработанных MCF7 клетках (TSA-treated MCF7 cells) по отношению к таковой в исходных клетках (MCF7 cells). Диагональная линия указывает на приблизительно одинаковую экспрессию в обеих группах (в границах изменения экспрессии в 2 раза). **Б.** Усредненная оценка активности сигнального пути Wnt в обработанных клетках по отношению к исходным клеткам.

ОТ-ПЦР анализ экспрессии GLCE, TCF4 и β -катенина (CTNN1) в опухолевых клетках MCF7 показал конститутивную экспрессию β -катенина и TCF4, а обработка клеток MCF7 5-аза-дезокситидином и трихостатином А не влияла на уровень экспрессии β -катенина, но увеличивала экспрессию TCF4 (2 раза) и GLCE (1,7 раза). Умеренная позитивная корреляция уровней экспрессии исследуемых генов (коэффициент корреляции Пирсона GLCE/TCF4 = 0.61, $p < 0,07$; GLCE/ β -катенин = 0.71, $p < 0,05$; TCF4/ β -катенин = 0,50, $p < 0.1$) хорошо согласуется с данными *in vivo*.

Прямое участие TCF4/ β -катенинового транскрипционного комплекса в регуляции экспрессии GLCE было подтверждено методом иммунопреципитации хроматина (ChIP-assay) с антителами к β -катенину и TCF4 для контрольных и обработанных трихостатином клеток MCF7.

Согласно данным ChIP-assay, хотя в опухолевых клетках MCF7 экспрессируются и TCF4, и β -катенин, промоторная область гена GLCE не взаимодействует с TCF4/ β -катениновым комплексом (Рисунок 12). Обработка опухолевых клеток Трихостатином А практически не влияла на экспрессию этих генов, однако значительно усиливала связывание TCF4/ β -катенинового комплекса с промоторным регионом GLCE и активировала экспрессию Д-глюкуронил С5-эпимеразы в обработанных клетках, подтверждая участие TCF4/ β -катенинового комплекса в регуляции активности экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы в опухолевых клетках молочной железы человека *in vitro*.

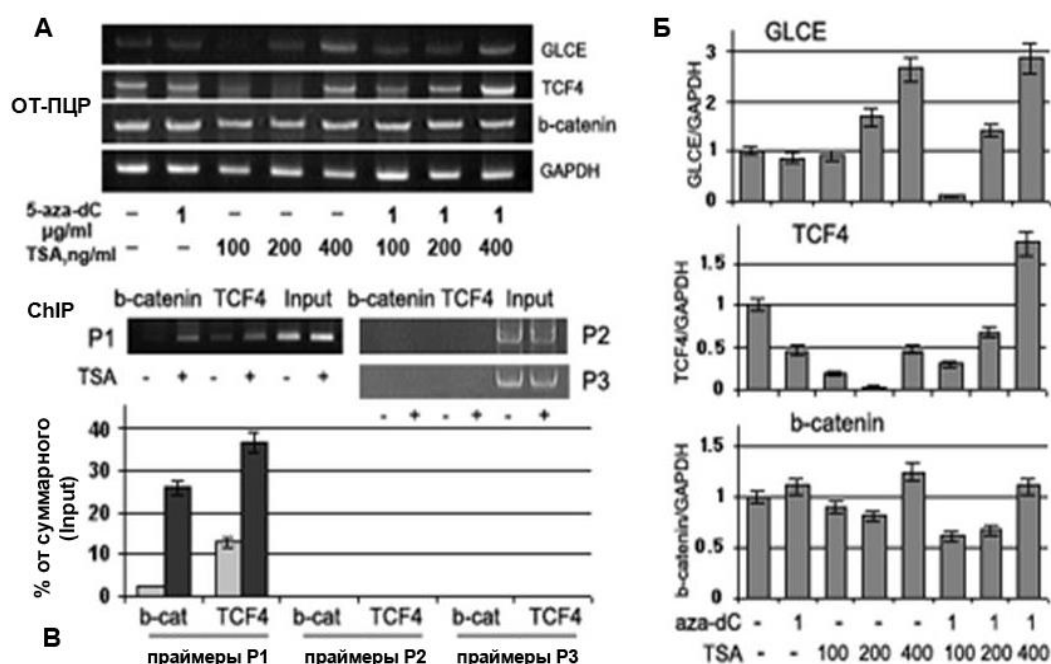


Рисунок 12. Влияние Трихостатина А на экспрессию GLCE, TCF4 и β-катенина в опухолевых клетках MCF7 *in vitro*. **А.** Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР. **Б.** Интенсивность амплифицированных фрагментов ДНК, нормализованная на GAPDH (средние значения ± SE трех экспериментов, OriginPro 8.1). **В.** ChIP assay для промоторного региона *GLCE* с анти-TCF4 или анти-β-catenin антителами. Праймеры 1 (P1) - TCF4-регуляторный регион, праймеры 2 и 3 (P2 и P3) - не TCF4-регуляторные регионы в качестве контроля. Количество иммуноосажденной ДНК нормализовано на суммарную ДНК, концентрация TSA 400ng/ml.

Эксперименты по определению уровня экспрессии GLCE, β-катенина (*CTNN1*) и TCF4 в клинических образцах опухолей молочной железы *in vivo* и опухолевых клетках рака молочной железы *in vitro* показали умеренную позитивную корреляцию экспрессии β-катенина и TCF4 (+0.54, $p < 0,01$) и TCF4 и GLCE (+0.62, $p < 0,01$), которая была еще более очевидна при анализе относительного уровня экспрессии изучаемых генов в опухолевой ткани по отношению к соответствующим контрольным тканям молочной железы (коэффициент корреляции Пирсона GLCE/TCF4 = 0.86, $p < 0,05$; GLCE/β-catenin = 0.68, $p < 0,05$; TCF4/β-catenin = 0.81, $p < 0,01$).

Таким образом, полученные результаты указывают на ведущую роль структуры хроматина для формирования активного TCF4/β-катенинового комплекса в промоторной области *GLCE* и подтверждают вовлеченность TCF4/β-катенинового комплекса и Wnt сигналинга в регуляцию экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы в тканях молочной железы человека *in vivo*.

• микроРНК

Возможность участия микроРНК-218 в инактивации *GLCE* в опухолевых тканях человека была исследована на примере двух видов опухолей – молочной и предстательной железы человека. Общая стратегия заключалась в сопоставлении уровней экспрессии исследуемых генов в клинических образцах опухолей и проведении экспериментов по экспериментальной регуляции уровня экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы на культурах клеток в системе *in vivo*.

Анализ уровня микроРНК-218 проводили с использованием набора реагентов TaqMan MicroRNA Assay (Invitrogen, США) показал, что экспрессия микроРНК-218 в нормальных тканях молочной железы носит чрезвычайно гетерогенный характер, а в соответствующих опухолевых тканях происходит значительное снижение уровня экспрессии микроРНК-218. Сравнительный анализ выявил наличие положительной корреляции между уровнем экспрессии микроРНК-218 и мРНК GLCE как в нормальных (коэффициент Пирсона $r = +0.45$, $p < 0.23$), так и в опухолевых ($r = +0.79$, $p < 0.01$) тканях молочной железы, что может говорить о согласованной регуляции их экспрессии в тканях молочной железы. В то же время, корреляция экспрессии микроРНК-218 и белковой молекулы Д-глюкуронил С5-эпимеразы носила негативный характер в обеих группах клинических образцов ($r = -0.45$, $p < 0.26$ для нормальной ткани и $r = -0.40$, $p < 0.30$ для опухолей молочной железы).

Чтобы подтвердить способность микроРНК-218 напрямую регулировать экспрессию GLCE, был проведен функциональный тест на культивируемых клетках карциномы молочной железы MCF7 *in vitro*, в котором опухолевые клетки MCF7 были трансфицированы синтетическими микро-РНК-218 или анти-микроРНК-218 олигонуклеотидами (Рисунок 13).

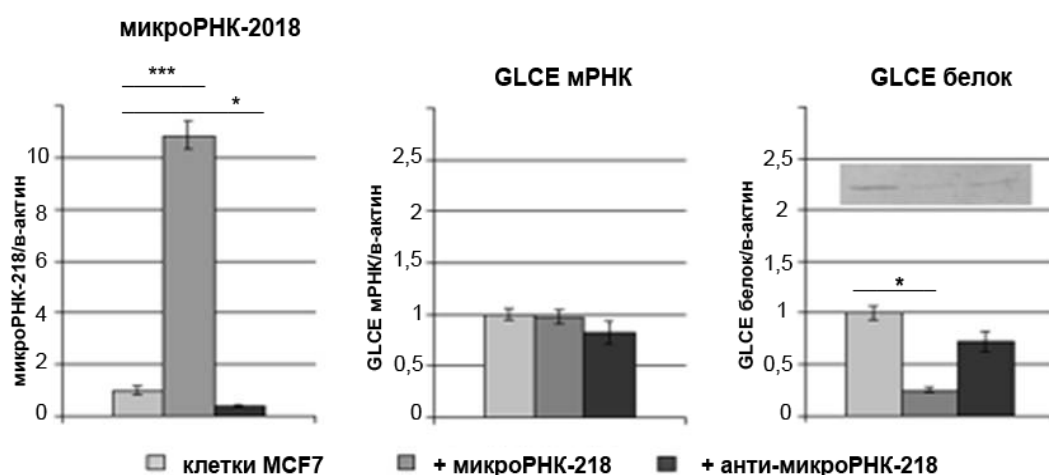


Рисунок 13. Влияние микроРНК-218 и анти-микроРНК-218 на уровень мРНК и белковой молекулы Д-глюкуронил С5-эпимеразы в опухолевых клетках карциномы молочной железы MCF7. Экспрессия микроРНК-218 - TaqMan MicroRNA Assay; уровень мРНК GLCE - Taqman-based qReal-Time RT-PCR; белковая молекула GLCE – Western Blot. Вставка – репрезентативный блот. Представлены средние значения $\pm$ SD трех экспериментов (OriginPro 8.1).

Согласно полученным результатам, ни экзогенная микроРНК-218, ни анти-микроРНК-218 не влияют на уровень мРНК Д-глюкуронил С5-эпимеразы, однако повышенная экспрессия микроРНК-218 приводит к значительному снижению уровня белковой молекулы GLCE в клетках карциномы MCF7, демонстрируя способность микроРНК-218 напрямую регулировать уровень экспрессии GLCE в культуре опухолевых клеток *in vitro*. Трансфекция клеток MCF7 анти-микроРНК-218 приводила к 2-3-кратному снижению содержания микроРНК-218, но не влияла на уровень белковой молекулы GLCE, что также свидетельствует в пользу сложного механизма регуляции Д-глюкуронил С5-эпимеразы на пост-транскрипционном уровне. Аналогичные данные были получены при изучении эффектов микроРНК-218 на экспрессию GLCE в опухолевых клетках предстательной железы человека *in vitro*.

Сравнительный анализ уровней экспрессии микроРНК-218 и GLCE в клинических образцах тканей предстательной железы *in vivo* показал, что в опухолях предстательной железы наблюдается прямая корреляция между уровнем микроРНК-218 и мРНК GLCE, однако очевидной корреляции микроРНК-218 с содержанием белковой молекулы GLCE показано не было. По-видимому, микроРНК-218 участвует в регуляции уровня экспрессии белковой молекулы GLCE в опухолевых клетках предстательной железы *in vitro* и, возможно, вносит свой вклад в сложный механизм регуляции активности Д-глюкуронил С5-эпимеразы в ткани предстательной железы *in vivo*, однако этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Таким образом, микроРНК-218 способна регулировать содержание белковой молекулы Д-глюкуронил С5-эпимеразы в культуре клеток рака молочной и предстательной железы *in vitro*, однако ее вклад в регуляцию уровня экспрессии GLCE в тканях молочной и предстательной желез *in vivo* не так очевиден. Вероятно, значительную роль играют также структура хроматина, TCF4/ β -катенин и другие не идентифицированные пока регуляторные факторы.

По совокупности полученных результатов, нами была предложена общая схема регуляции экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы (Рисунок 14).

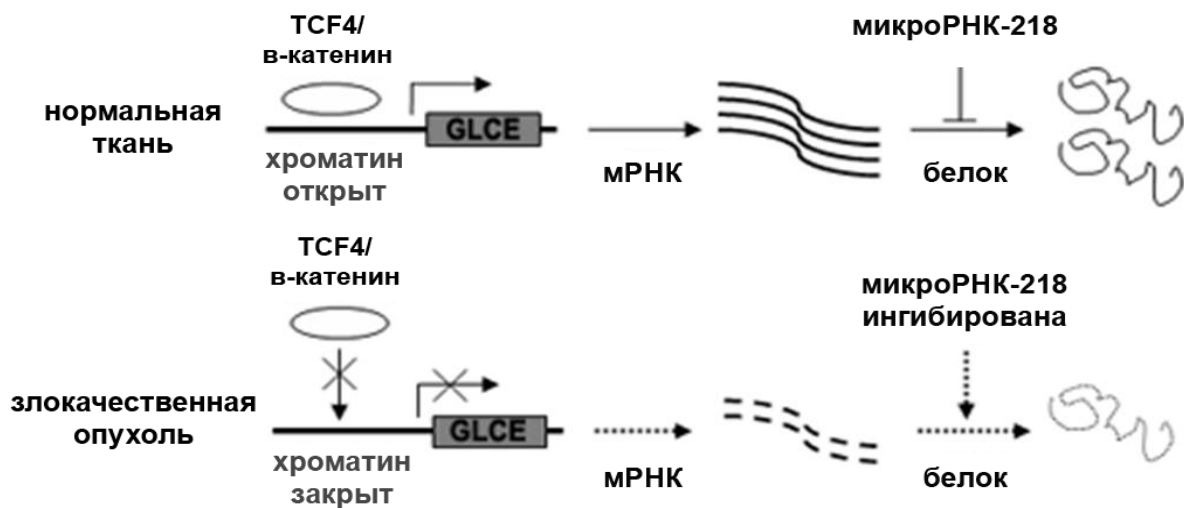


Рисунок 14. Схематическое представление регуляции экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы в нормальных и опухолевых тканях человека.

В нормальной ткани молочной железы человека, уровень мРНК Д-глюкуронил С5-эпимеразы транскрипционно регулируется прямым взаимодействием TCF4/ β -катенин транскрипционного комплекса с промоторной областью *GLCE* и содержание белковой молекулы GLCE далее корректируется за счет прямого влияния микроРНК-218 на посттранскрипционном уровне. В опухолевой ткани молочной железы взаимодействие TCF4/ β -катенинового комплекса с промоторной областью *GLCE* блокировано вследствие общей инактивации хроматина в области промотора *GLCE*, приводя к значительному снижению уровня мРНК и белковой молекулы GLCE mRNA, несмотря на отсутствие регулирующего воздействия микроРНК-218. Предложенная схема предполагает многоуровневый молекулярный механизм регуляции экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы в нормальной ткани и модель ее дерегуляции в опухолях молочной железы человека.

В целом, полученные данные свидетельствуют о сложном механизме регуляции уровня экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы в опухолевых клетках, который в основном определяется структурой хроматина в зоне промотора гена GLCE, активацией специфических транскрипционных факторов и пост-транскрипционной регуляцией ее экспрессии за счет микроРНК.

Функциональная активность Д-глюкуронил С5-эпимеразы в нормальных и опухолевых тканях и клетках

Поскольку экспрессия Д-глюкуронил С5-эпимеразы (GLCE) значительно снижена в опухолях молочной и предстательной железы человека, это может свидетельствовать о возможном участии GLCE в процессе злокачественной трансформации. Для изучения функциональной значимости подавления экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы в опухолевых тканях в процессе канцерогенеза был выбран подход, который заключался в восстановлении экспрессии/функции данного фермента в различных линиях опухолевых клеток человека с последующим анализом их функциональных характеристик *in vitro* и *in vivo*. Для этого полноразмерный ген Д-глюкуронил С5-эпимеразы человека (GLCE, NM015554) был клонирован в плазмидные вектора, обеспечивающие эписомальную экспрессию GLCE в целевых клетках:

- Tet-Off вектор pETE\Bsd - для регулируемой экспрессии гена в tTA-продуцирующих клетках млекопитающих, предварительно трансфецированных генно-инженерной конструкцией, позволяющей проводить регулируемую экспрессию целевого гена при помощи тетрациклина (Tet-responsive construct);
- pCER4 вектор – для экспрессии гена в стандартных клеточных линиях.

Полученные конструкции со вставкой гена Д-глюкуронил С5-эпимеразы обозначались как epi-pETE и epi-pCER4. Нуклеотидная последовательность GLCE в конечных конструкциях была подтверждена секвенированием.

Для изучения влияния GLCE на пролиферацию опухолевых клеток *in vitro* были использованы tTA-продуцирующие варианты клеточных линий U2020 (мелкоклеточный рак легкого) и LNCaP (карцинома простаты), которые были трансфецированы конструкцией epi-pETE\Bsd или исходной плазмидой pETE\Bsd с последующей селекцией стабильно трансфецированных клонов. Клетки MCF7 (карцинома молочной железы) были трансфецированы плазмидой epi-pCER4.

Функциональная активность Д-глюкуронил С5-эпимеразы в отношении опухолевых клеток молочной железы *in vitro*

Д-глюкуронил С5-эпимераза практически не экспрессируется в клетках MCF7, в то время как в нормальной ткани молочной железы человека уровень ее экспрессии значительно выше. Трансфекция этих клеток плазмидой epi-pCER4 и селекция стабильно трансфецированных клонов позволили нам получить клеточные клоны с различным уровнем эктопической экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы (epi-MCF7).

Митотическая активность и жизнеспособность исходных и стабильно трансфецированных эпимеразой опухолевых клеток MCF7 *in vitro* были исследованы в тестах на формирование колоний (Colony Formation Test) и пролиферативную активность изучаемых клеток (CyQUANT NF Cell Proliferation Assay).

Было показано, что эктопическая экспрессия Д-глюкуронил С5-эпимеразы не влияет на жизнеспособность опухолевых клеток MCF7, но значительно супрессирует их пролиферативную активность *in vitro*. Сочетание этих двух эффектов эктопической экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы в клетках MCF7 позволяет высказать предположение о ее регуляторной, а не исключительно супрессорной, функции в определении пролиферативной активности клеток.

Молекулярные механизмы антипролиферативного эффекта Д-глюкуронил С5-эпимеразы для карциномы молочной железы человека *in vitro* исследовали с использованием системы Cancer PathFinder RT Profiler PCR Array (SABiosciences) (регуляция клеточного цикла, передача сигнальной информации, апоптоз, ангиогенез, адгезия, инвазия и метастазирование) (Рисунок 15).

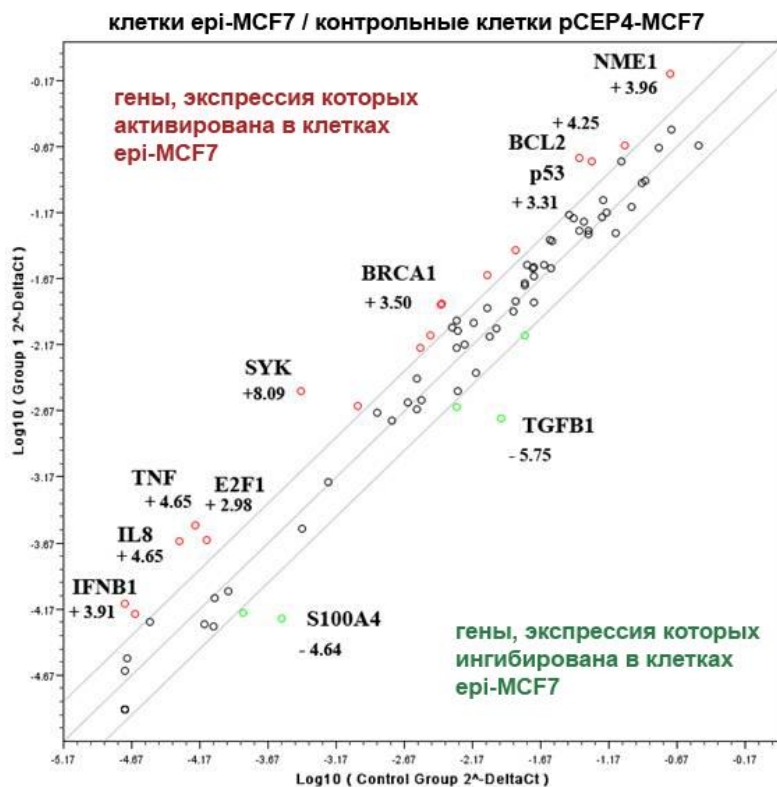


Рисунок 15. Гены, экспрессия которых наиболее значительно изменена в клетках MCF7, активно экспрессирующих Д-глюкуронил С5-эпимеразу человека (epi-MCF7), по сравнению с клетками MCF7, трансфицированными плазмидой pCER4 (pCER4-MCF7). (+) – усиление экспрессии, (-) – подавление экспрессии в определенное количество раз.

Наиболее значимые изменения уровня экспрессии канцерогенез-ассоциированных генов в клетках epi-MCF7 под действием эктопической экспрессии GLCE можно приблизительно отнести к 3 основным механизмам: усиление экспрессии опухоль-супрессирующих генов (p53, BRCA1, SYK) генов, отнесенных к молекулярным механизмам ангиогенеза (IL8, IFNB1, TNF, TGFB1) и генов-супрессоров метастазирования (SYK, NME1, S100A4).

Функциональная активность Д-глюкуронил С5-эпимеразы в отношении рака предстательной железы

Для изучения вопроса о тканеспецифичности возможного антипролиферативного действия Д-глюкуронил С5-эпимеразы, аналогичные эксперименты были проведены для клеток предстательной железы - нормальные (PNT2) и опухолевые (LNCaP, PC3 и DU145) клетки. Стабильные клеточные клоны были получены для опухолевых клеток LNCaP и PC3, экспрессию GLCE в контрольных клетках и полученных стабильных клонах epi-LNCaP и epi-PC3 определяли на транскрипционном и белковом уровне методами ОТ-ПЦР и иммуноцитохимического анализа (Рисунок 16).

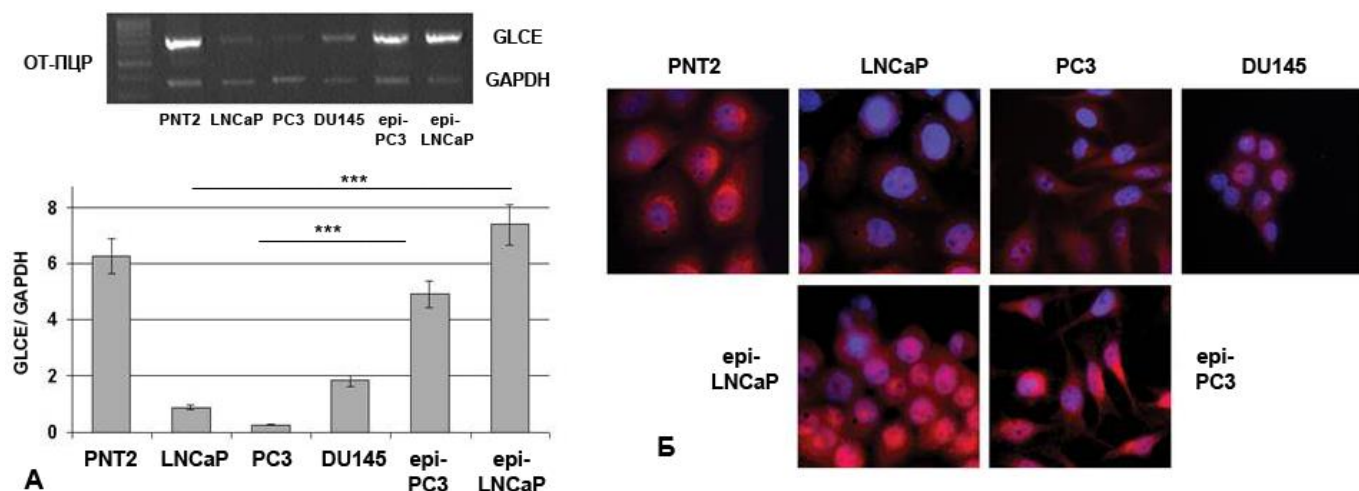


Рисунок 16. Влияние Д-глюкуронил С5-эпимеразы на пролиферативную активность опухолевых клеток предстательной железы человека LNCaP *in vitro*. **А.** Экспрессия GLCE в стабильно трансфицированных клонах LNCaP (epi-LNCaP), мультиплексный ОТ-ПЦР, электрофореграмма. М - маркер, 2,4,5 - клоны. **Б.** Пролиферативная активность трансфицированных клеток (CyQUANT NF Cell Proliferation Assay). В качестве контроля использовали клетки исходных линий, несущие пустую плазмиду (pCER4-LNCaP).

Уровень экспрессии Д-глюкуронил С5-эпимеразы в клонах с эктопической экспрессией эпимеразы (epi-LNCaP, epi-PC3) был значительно выше, чем в контрольных LNCaP и PC3 клетках и сопоставим с таковым в нормальных эпителиальных клетках предстательной железы PNT2. Иммуноцитохимический анализ также подтвердил увеличение содержания белковой молекулы GLCE в полученных клонах. CyQUANT NF Cell Proliferation Assay анализ показал снижение пролиферативной активности опухолевых клеток предстательной железы LNCaP, трансфицированных плазмидой epi-LNCaP, по сравнению с контрольными клетками.

Согласно результатам Cancer PathFinder RT Profiler PCR Array, эктопическая экспрессия Д-глюкуронил С5-эпимеразы в клетках рака предстательной железы (LNCaP, PC3) *in vitro* также влияет в основном на молекулярный механизм регуляции ангиогенеза (VEGFA, THBS1, TGFBR1, IGF1, FGFR2, ANGPT) и экспрессию генов, связанных с процессами инвазии и метастазирования (TIMP3, TIMP1, TWIST1, MMP2, MMP9, MMP1) (Рисунок 17).

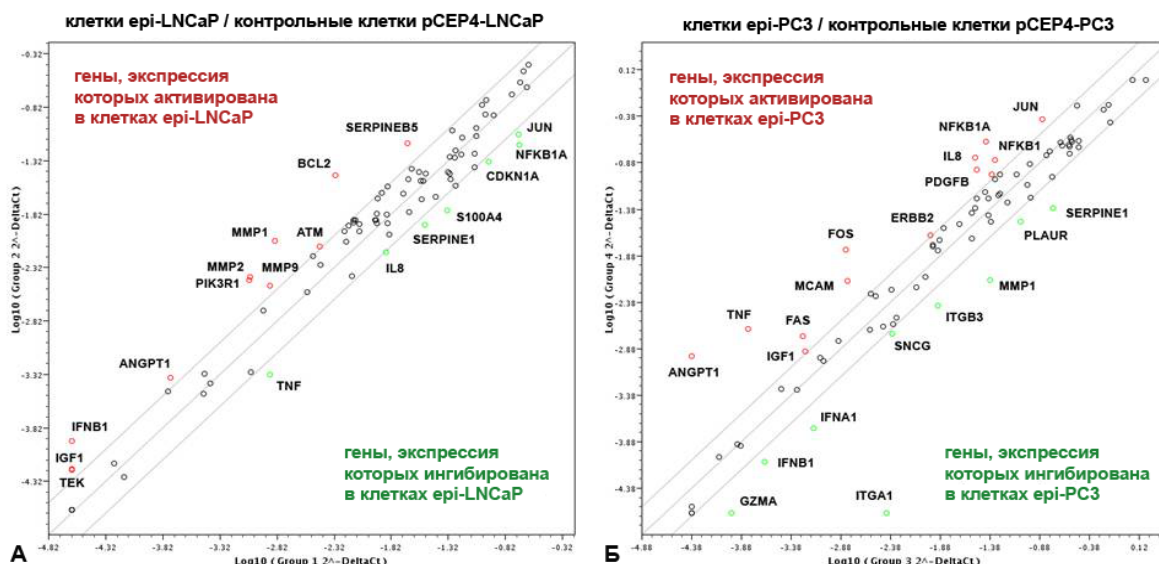


Рисунок 17. Гены, экспрессия которых наиболее значительно изменена в опухолевых клетках предстательной железы человека LNCaP и PC3, эктопически экспрессирующих Д-глюкуронил С5-эпимеразу человека (Cancer PathFinder RT2 Profiler PCR Array). Диагональ соответствует одинаковой экспрессии определенного гена в клетках LNCaP (А) и PC3 (Б) и контрольных клетках рСЕР4-LNCaP и рСЕР4-PC3, границы соответствуют 2-кратному изменению экспрессии в ту или иную сторону.

Статистический анализ ассоциации между уровнем экспрессии GLCE в опухолях предстательной железы и клиническими данными показал, что в образцах рака предстательной железы повышенная экспрессия GLCE положительно ассоциирована с прогрессированием заболевания (коэффициенты корреляции Пирсона GLCE / Глисон = 0,56, $p < 0,05$, GLCE / TNM = 0,62, $p < 0,05$ и GLCE / PSA = 0,88, $p < 0,01$). Полученные результаты показали высокую положительную корреляцию между повышенной экспрессией GLCE и уровнем ПСА, оценкой Глисона и классификацией TNM опухолей предстательной железы, что может говорить о том, что для рака предстательной железы GLCE является молекулярным маркером агрессивного течения заболевания и потенциальной мишенью для новых методов лечения.

Функциональная активность Д-глюкуронил С5-эпимеразы в отношении мелкоклеточного рака легкого

Еще один тип опухоли, для которого изучали функциональные эффекты Д-глюкуронил С5-эпимеразы – мелкоклеточный рак легкого. Согласно данным ОТ-ПЦР, экспрессия Д-глюкуронил С5-эпимеразы снижена в 3-6 раз во всех исследованных клеточных линиях мелкоклеточного (U2020) и немелкоклеточного (A716, A549, H647, H157) рака легкого человека по сравнению с нормальной тканью легкого человека.

Д-глюкуронил С5-эпимеразы была эктопически гиперэкспрессирована в клетках мелкоклеточного рака легкого U2020, которые были трансфицированы плазмидной конструкцией (epi-pETE-BSD), позволяющей проводить контролируемую активацию изучаемого гена *in vitro* и *in vivo* добавлением тетрациклина (tet-on/tet-off system). Были получены клеточные клоны epi-U2020, стабильно экспрессирующие GLCE и контрольные клоны, несущие пустую плазмиду. Значительное повышение уровней экспрессии GLCE в

трансфицированных клетках было показано как на транскрипционном, так и на белковом уровне с использованием мультиплексной ОТ-ПЦР и иммунофлуоресцентного окрашивания. Стабильные клоны с наивысшей экспрессией Д-глюкуронил С5-эпимеразы были использованы для изучения влияния GLCE на морфологию и функциональные характеристики клеток рака легкого. Согласно тесту на формирование колоний, эктопическая экспрессия GLCE в трансфицированных клетках рака легкого U2020 не влияла на жизнеспособность этих клеток, однако изменяла их морфологию и значительно снижала пролиферативную активность epi-pETE-U2020 клеток мелкоклеточного рака легкого по сравнению с исходными клетками U2020 (Рисунок 18).

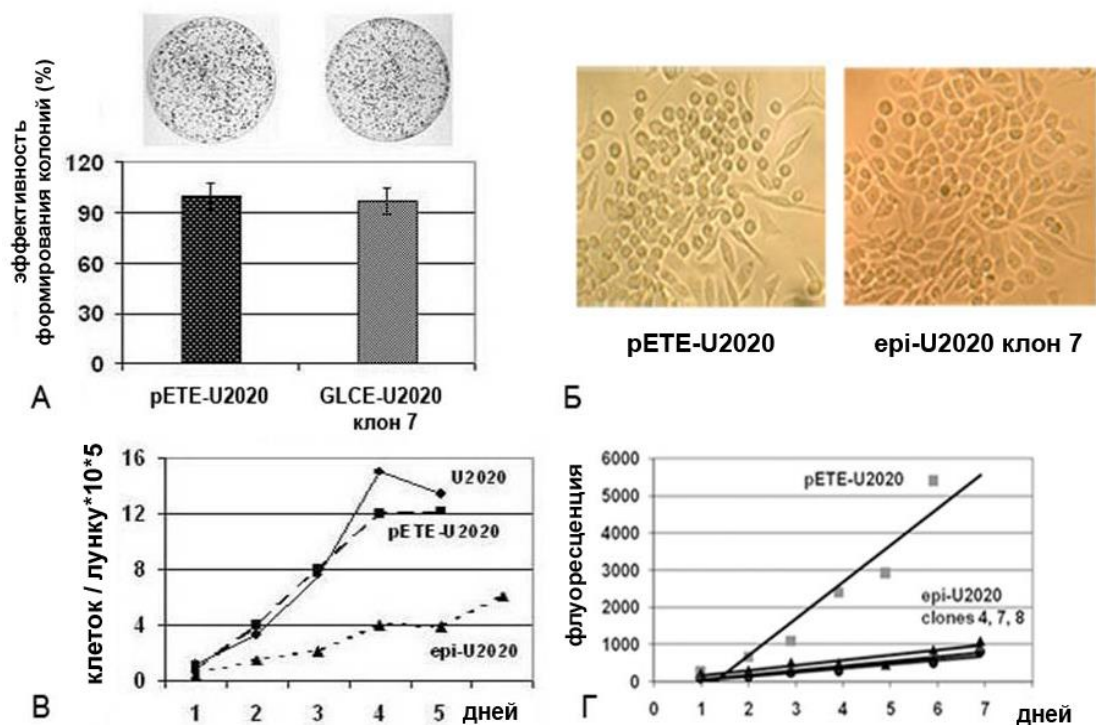


Рисунок 18. Влияние Д-глюкуронил С5-эпимеразы на функциональные характеристики опухолевых клеток U2020 *in vitro*. **А.** Жизнеспособность клеток (тест на образование колоний). **Б.** Морфология исходных и трансфицированных клеток. **В, Г.** - пролиферативная активность стабильных клонов U2020 согласно прямому методу подсчета клеток (**В**) и CyQUANT NF Cell Proliferation Assay (**Г**). В качестве контроля использовали клетки исходных линий, несущие пустую плазмиду.

Согласно результатам Cancer PathFinder RT2 Profiler™ PCR Array, в опухолевых клетках U2020, экспрессирующих GLCE (трансфицированных плазмидой epi-pETE/Vsd, epi-U2020) экспрессия 52 генов оставалась неизменной, а 32 генов из 84 подвергалась более чем 2-кратному изменению (повышению или понижению). Антипролиферативный эффект Д-глюкуронил С5-эпимеразы в клетках мелкоклеточного рака легкого человека U2020 *in vitro* в основном реализуется через изменение экспрессии факторов роста (VEGF-A, PDGF-A, PDGF-B, TGFB1, TNFα, IGF1) и их рецепторов (FGFR2, TGFB1R, TNFRSF10B, TNFRSF1A, TNFRSF25, FAS, HGFR/MET) и влияние на гены, относящиеся к процессам ангиогенеза (VEGF-A, TGFB1, FGFR2, PDGF-A и PDGF-B, коллаген XVIII) и инвазии/метастазирования (MMP2, MTA1, PLAU, TIMP3, S100A4, SERPINE1, TWIST1).

Антиопухолевая активность GLCE в системе *in vivo*

Поскольку способность какого-либо гена подавлять развитие опухоли можно подтвердить только в системе *in vivo*, нами был использован специальный тест для определения функциональной значимости целевого гена в процессе канцерогенеза, основанный на эффекте инактивации супрессорных генов в растущих экспериментальных опухолях (GIT – Gene Inactivation Test) (Protopopov *et al.*, 2002). Его основная идея заключается в следующем – опухолевые клетки трансфецируются плазмидой, несущей исследуемый ген и затем проводится селекция стабильно трансфецированных клонов. Трансфецированные клетки инокулируют мышам линии SCID (Severe Combined Immunodeficiency) и проводят детальный молекулярный анализ выросших опухолей (ПЦР, Вестерн блоттинг, иммуногистохимический анализ) и сравнение экспрессии исследуемого гена в клетках до инокуляции и в выросших из них опухолях. Базовым в используемом подходе является факт исчезновения экспрессии трансгена в экспериментальной опухоли: если ген является супрессором, то его экспрессия в опухолевых клетках будет тормозить их пролиферацию и опухоли не должны развиваться. Если опухоли вырастают, то значит, ген каким-то образом был инактивирован (например, произошла мутация или делеция).

В нашей работе, суспензия опухолевых клеток U2020, стабильно трансфецированных плазмидой epi-rETE\Bsd (epi-U2020) была инокулирована иммунодефицитным мышам линии SCID (Рисунок 19).

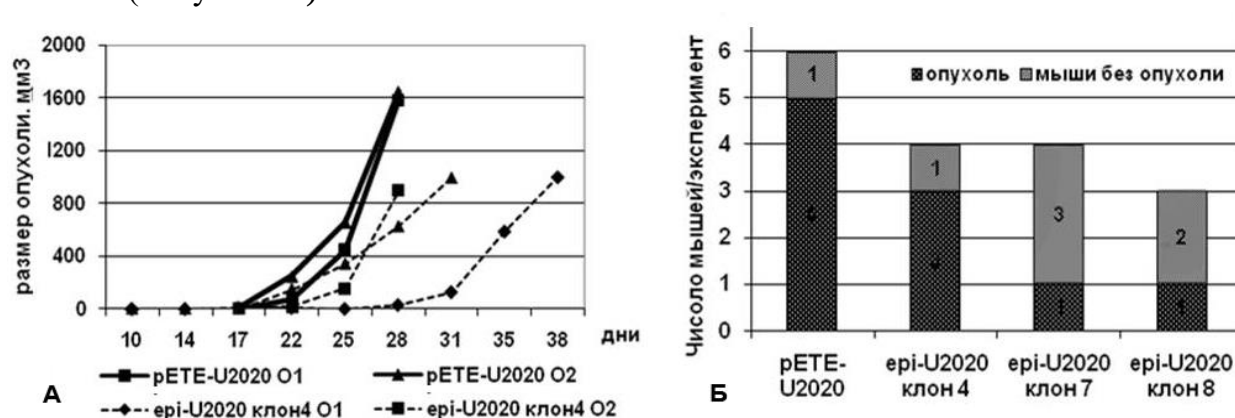


Рисунок 19. Влияние GLCE на рост экспериментальных опухолей U2020 у иммунодефицитных мышей линии SCID. Для инокуляции использовали epi-U2020 клоны 4, 7 и 8, в качестве контроля – клетки, несущие пустую плазмиду pETE-U2020. **А.** Кривые роста опухолей. **Б.** Количество выросших опухолей в каждой группе животных.

Практически все экспериментальные опухоли epi-U2020 росли значительно медленнее по сравнению с контрольными pETE-2020 либо не выросли вообще. Уровень экспрессии GLCE в выросших опухолях был значительно ниже, чем в исходных клетках epi-U2020, использованных для введения SCID мышам (720-960 молекул GLCE/1000 молекул GAPDH в исходных клетках, использованных для инокуляции). Иммуногистохимический анализ подтвердил отсутствие белковой молекулы GLCE в экспериментальных опухолях, что подтверждает предположение об инактивации GLCE как необходимого условия развития опухоли и позволяет рассматривать Д-глюкуронил С5-эпимеразу в качестве гена-супрессора развития опухоли.

Для изучения молекулярных особенностей выросших экспериментальных опухолей (в которых экспрессия GLCE не определяется) и опухолеподобных телец (ОТ, экспрессирующих эпимеразу и не развившихся в полноценные опухоли) также был использован набор Human Cancer PathwayFinder RT2Profiler PCR Array (SABioscience). Антиопухолевый эффект Д-глюкуронил С5-эпимеразы в отношении мелкоклеточного рака легкого *in vivo* также связан с изменением экспрессии 26 генов, относящихся в основном к молекулярным путям **ангиогенеза** (IGF1, IFNA1, IFNB1, TGFB1, FGFR2, PDGFA, ANGPT1, THBS1) и **апоптоза** (HTATIP2, BCL2, TNF, TNFRSF6, TNFRSF10B, BCL2L1, CFLAR). Кроме того, в меньшей степени изменены уровни экспрессии генов, участвующих в процессах адгезии (ITGA1, ITGA3, ITGB5, ITGB3) и инвазии/метастазирования (SNCG, NME1, MMP9, MET, SERPINE1).

Полученные результаты показывают, что антипролиферативный эффект Д-глюкуронил С5-эпимеразы *in vivo* осуществляется через более сложную регуляцию молекулярных путей канцерогенеза, чем *in vitro*. Эктопическая экспрессия GLCE в клетках мелкоклеточного рака легких значительно подавляет опухолевый ангиогенез, супрессируя тем самым развитие экспериментальных опухолей, что впервые позволяет предположить этот ген в качестве эндогенного регулятора процесса опухолевого ангиогенеза.

В целом, для всех исследованных опухолевых клеток показано, что Д-глюкуронил С5-эпимераза влияет на пролиферацию опухолевых клеток *in vitro* и рост экспериментальных опухолей *in vivo* в основном через регуляцию экспрессии генов ангиогенеза. Наряду с этим, тканеспецифичное влияние GLCE проявляется в регуляции экспрессии различных генов супрессоров опухолевого роста (клетки рака молочной железы) или факторов роста (клетки мелкоклеточного рака легкого). Также во всех исследованных типах клеток Д-глюкуронил С5-эпимераза влияла на гены, участвующие в инвазии и метастазировании, что может говорить о ее потенциальном антиметастатическом эффекте *in vivo*. Регуляция экспрессии самой Д-глюкуронил С5-эпимеразы находится под контролем сложного комплекса эпигенетических процессов, а ее способность супрессировать развитие злокачественных опухолей позволяет рассматривать этот ген как основу для создания новых препаратов для генотерапии злокачественных опухолей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение молекулярных механизмов канцерогенеза и роли различных биологических макромолекул в этом процессе остаются актуальнейшей задачей современной онкологии. Современные подходы заключаются в активном исследовании микроокружения опухоли и поиске внеклеточных биомаркеров для диагностики, прогноза и лечения этого заболевания. Особое внимание при этом привлекают такие ключевые компоненты внеклеточного матрикса и опухолевого микроокружения как гепарансульфат протеоглики. Однако исследования в этой области сосредоточены в основном на детальном изучении различных представителей этого класса макромолекул преимущественно на уровне их коровых белков и соответствующих генов. В то же время структура и состав углеводных цепей гепарансульфата в нормальных тканях человека и их изменение в злокачественных опухолях остаются недостаточно изученными, как и молекулярные механизмы изменений ГС в процессе канцерогенеза.

Представленная работа включает два направления исследования, связанные с общей характеристикой системы биосинтеза углеводных цепей гепарансульфата (ГС) и детальным изучением одного из ключевых ферментов биосинтеза гепарансульфата – Д-глюкуронил С5-эпимеразы (GLCE). Впервые было показано, что гены, кодирующие различные ферменты системы биосинтеза ГС, экспрессируются в нормальных тканях человека в тканеспецифичной манере. В злокачественных опухолях значительным изменениям подвергаются как общий уровень транскрипционной активности этих генов, так и паттерн их экспрессии, что неизбежно приводит к изменению структуры и содержания гепарансульфата в клетках и тканях. Эти данные могут служить основой для принципиально новой стратегии создания тканеспецифичных антиопухолевых препаратов для восстановления корректного функционирования системы биосинтеза ГС, с минимальными побочными эффектами в отношении других типов тканей.

Параллельно, в опухолях происходят изменения уровней экспрессии генов, кодирующих коровые белки протеогликанов, и эти два процесса совокупно определяют широкую гамму изменений структуры и количества протеогликанов, синтезируемых опухолевой клеткой. В целом, полученные данные имеют как фундаментальную значимость для понимания молекулярных механизмов регуляции биосинтеза ГС, так и могут иметь практическое значение в качестве тканеспецифичных биомаркеров (позволяющих определить, например, морфологическое происхождение метастазов) и/или диагностических/прогностических маркеров заболевания.

Другим важным результатом данного исследования является то, что впервые была проведена детальная характеристика гена Д-глюкуронил С5-эпимеразы. Показано, что этот ген может быть отнесен к классу генов-супрессоров развития опухоли, играет важную роль в процессе злокачественной трансформации клеток и тканей и может оказаться перспективным для создания новых лекарственных препаратов для лечения рака. Наиболее очевидным перспективой может быть создание таргетных генно-инженерных конструкций или вирусных препаратов, несущих этот ген, для генотерапии опухолей и их испытание на экспериментальных животных. Однако параллельно возможно разрабатывать также альтернативные подходы, такие как синтетические или эндогенные активаторы Д-глюкуронил С5-эпимеразы в клетках – такие, например, как трихостатин А, который активирует экспрессию GLCE в клетках рака молочной и предстательной желез человека. Это вещество рассматривается в настоящее время как потенциальный антиопухолевый препарат, а применение его для лечения опухолей со сниженной экспрессией GLCE могло бы значительно увеличить эффективность такого лечения.

Также очень важно провести оценку антиметастатического эффекта Д-глюкуронил С5-эпимеразы в каких-либо экспериментальных системах спонтанного или индуцированного метастазирования. Полученные нами результаты предполагают, что GLCE может снижать скорость метастазирования опухолей, являясь потенциальным антиметастатическим препаратом. Создание нового антиопухолевого и/или антиметастатического таргетного препарата на основе Д-глюкуронил С5-эпимеразы может оказаться полезным для расширения арсенала терапевтических средств борьбы со злокачественными опухолями и улучшения качества и повышения продолжительности жизни пациентов.

ВЫВОДЫ

1. Транскрипционная активность и паттерн экспрессии системы биосинтеза гепарансульфата являются специфичными для каждой нормальной ткани организма человека. В процессе злокачественной трансформации происходят как количественные, так и качественные изменения общего уровня экспрессии и транскрипционных паттернов генов, вовлеченных в биосинтез гепарансульфата, которые также носят тканеспецифичный характер.
2. Помимо изменений в системе биосинтеза ГС, в опухолях различной этиологии происходят количественные и качественные изменения экспрессии коровых белков ГСПГ. Обеспечивая биосинтез двух составляющих частей сложной молекулы протеогликана, эти 2 компонента изменяются относительно независимо в опухолевых клетках и тканях, и их баланс определяет тип нарушений финальной молекулы ГСПГ:
 - в опухолях молочной железы система биосинтеза не меняется, но есть изменения в экспрессии коровых белков;
 - в опухолях предстательной железы происходит снижение общего уровня экспрессии генов системы биосинтеза ГС, в то время как экспрессия коровых белков достоверно не изменяется;
 - в опухолях прямой кишки уровень экспрессии генов системы биосинтеза ГС и коровых белков протеогликанов не нарушается, однако происходят изменения общих паттернов их экспрессии;
 - в глиомах происходит снижение транскрипционной активности генов системы биосинтеза ГС и повышение уровней экспрессии коровых белков.
3. Экспрессия гена Д-глюкуронил С5-эпимеразы (*GLCE*) значительно снижается в злокачественных опухолях различной этиологии (рак молочной и предстательной желез человека, мелкоклеточный рак легкого).
4. Регуляция экспрессии гена Д-глюкуронил С5-эпимеразы осуществляется как на генетическом (SNP полиморфизм rs3865014), так и на эпигенетическом уровнях - через сложный механизм, в который вовлечены гиперметилование промоторной области *GLCE* (в ограниченной степени), структура хроматина в районе промоторной области *GLCE*, транскрипционный комплекс TCF4/ β -катенин и пост-транскрипционная регуляция с помощью микроРНК-218.
5. Д-глюкуронил С5-эпимераза является геном-супрессором развития опухоли и влияет на пролиферацию опухолевых клеток *in vitro* и рост экспериментальных опухолей *in vivo* в основном через регуляцию экспрессии генов ангиогенеза. Наряду с этим, тканеспецифичность влияния Д-глюкуронил С5-эпимеразы проявляется дополнительно в регуляции экспрессии различных генов-супрессоров опухолевого роста (клетки рака молочной железы) или факторов роста (клетки мелкоклеточного рака легкого). Также во всех исследованных типах клеток Д-глюкуронил С5-эпимераза влияет на гены, участвующие в инвазии и метастазировании, что может говорить о ее потенциальном антиметастатическом эффекте *in vivo*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Kazanskaya G.M., Tsidulko A.Y., Volkov A.M., Kiselev R.S., Suhovskih A.V., Kobozev V.V., Gaytan A.S., Aidagulova S.V., Krivoschapkin A.L., **Grigorieva E.V.** Heparan sulfate accumulation and perlecan/HSPG2 up-regulation in tumour tissue predict low relapse-free survival for patients with glioblastoma // *Histochem Cell Biol.* 2018. V. 149(3). P. 235-244.
2. Суховских А.В., **Григорьева Э.В.** Протеогликаны в нормальной физиологии и канцерогенезе // *Успехи молекулярной онкологии.* 2018. Т. 5. №1. Стр. 8-25.
3. Ushakov V.S., Tsidulko A.Y., de La Bourdonnaye G., Kazanskaya G.M., Volkov A.M., Kiselev R.S., Kobozev V.V., Kostromskaya D.V., Gaytan A.S., Krivoschapkin A.L., Aidagulova S.V., **Grigorieva E.V.** Heparan sulfate biosynthetic system is inhibited in human glioma due to EXT1/2 and HS6ST1/2 down-regulation // *Int J Mol Sci.* 2017. V. 18(1). P. 2301-2311.
4. Tsidulko A.Y., Kazanskaya G.M., Kostromskaya D.V., Aidagulova S.V., Kiselev R.S., Volkov A.M., Kobozev V.V., Gaitan A.S., Krivoschapkin A.L., **Grigorieva E.V.** Prognostic relevance of NG2/CSPG4, CD44 and Ki-67 in patients with glioblastoma // *Tumor Biol.* 2017. V. 39(9):1010428317724282.
5. Belyavskaya V.A., Prudnikova T.Y., Domanitskaya N.V., Litviakov N.V., Maksimov V.N., Cherdyntseva N.V., **Grigorieva E.V.** GLCE rs3865014 (Val597Ile) polymorphism is associated with breast cancer susceptibility and triple-negative breast cancer in Siberian population // *Gene.* 2017. V. 628. P. 224-229.
6. Suhovskih A.V., Kashuba V.I., Klein G., **Grigorieva E.V.** Prostate cancer cells specifically reorganize epithelial cell-fibroblast communication through proteoglycan and junction pathways // *Cell Adh Migr.* 2017. V. 11(1). P. 39-53.
7. Suhovskih A.V., **Grigorieva E.V.** Тканеспецифичность экспрессии протеогликанов в различных типах опухолей человека // *Успехи молекулярной онкологии.* 2016. Т. 3, №1, Стр. 53-56.
8. Tsidulko A.Y., Matskova L., Astakhova L., Ernberg I., **Grigorieva E.V.** Proteoglycan expression correlates with the phenotype of malignant and non-malignant EBV-positive B-cell lines // *Oncotarget.* 2015. V. 6(41). P. 43529-43539.
9. Suhovskih A.V., Domanitskaya N.V., Tsidulko A.Y., Prudnikova T.Y., Kashuba V.I., **Grigorieva E.V.** Tissue-specificity of heparan sulfate biosynthetic machinery in cancer. *Cell Adh Migr.* 2015. V. 9(6). p. 452-459.
10. Suhovskih A.V., Aidagulova S.V., Kashuba V.I., **Grigorieva E.V.** Proteoglycans as potential microenvironmental biomarkers for colon cancer // *Cell Tiss Res.* 2015. V. 361(3). P. 833-844.
11. Suhovskih A.V., Tsidulko A.Y., Kutsenko O.S., Kovner A.V., Aidagulova S.V., Ernberg I., **Grigorieva E.V.** Transcriptional Activity of Heparan Sulfate Biosynthetic Machinery is Specifically Impaired in Benign Prostate Hyperplasia and Prostate Cancer // *Front Oncol.* 2014. V. 4:79.
12. Rosenberg E.E., Prudnikova T.Y., Zabarovsky E.R., Kashuba V.I., **Grigorieva E.V.** D-glucuronyl C5-epimerase cell type specifically affects angiogenesis pathway in different prostate cancer cells // *Tumor Biol.* 2014. V. 35(4). P. 3237-3245.

13. Prudnikova T.Y., Soultzis N., Kutsenko O.S., Mostovich L.A., Haraldson K., Ernberg I., Kashuba V.I., Spandidos D.A., Zabarovsky E.R., **Grigorieva E.V.** Heterogeneity of D-glucuronyl C5-epimerase expression and epigenetic regulation in prostate cancer // *Cancer Med.* 2013. V. 2(5). P. 654-661.
14. Suhovskih A.V., Mostovich L.A., Kunin I.S., Boboev M.M., Nepomnyashchikh G.I., Aidagulova S.V., **Grigorieva E.V.** Proteoglycan expression in normal human prostate tissue and prostate cancer // *ISRN Oncol.* 2013. V. 2013:680136.
15. Mostovich L.A., Prudnikova T.Y., Kondratov A.G., Gubanova N.V., Kharchenko O.A., Kutsenko O.S., Vavilov P.V., Haraldson K., Kashuba V.I., Ernberg I., Zabarovsky E.R., **Grigorieva E.V.** The TCF4/ β -catenin pathway and chromatin structure cooperate to regulate D-glucuronyl C5-epimerase expression in breast cancer // *Epigenetics.* 2012. V. 7:8.
16. Prudnikova T.Y., Mostovich L.A., Kashuba V.I., Ernberg I., Zabarovsky E.R., **Grigorieva E.V.** miRNA-218 contributes to the regulation of D-glucuronyl C5-epimerase expression in normal and tumor breast tissues // *Epigenetics.* 2012. V. 7(10). P. 1109-1114.
17. Кунин И.С., Бобоев М.М., Куценко О.С., Мостович Л.А., Айдагулова С.В., **Григорьева Э.В.** Молекулярные маркеры метастазирования аденокарциномы предстательной железы // *Онкоурология.* 2012. Т. 4. Стр. 48-53.
18. Kutsenko O.S., Kovner A.V., Mostovich L.A., Kunin I.S., Nepomnyashchikh R.D., Prudnikova T.Y., **Grigor'eva E.V.** Expression of heparanase-1 in prostate gland tumors // *Bull Exp Biol Med.* 2012. V. 152(3). P. 344-347.
19. **Grigorieva E.V.**, Prudnikova T.Y., Domanitskaya N.V., Mostovich L.A., Pavlova T.V., Kashuba V.I., Zabarovsky E.R. D-Glucuronyl C5-epimerase suppresses small-cell lung cancer cell proliferation in vitro and tumour growth in vivo // *Br J Cancer.* 2011. V. 105(1). P. 74-82.
20. Мостович Л.А., Прудникова Т.Ю., Доманицкая Н.В., Вержбицкая Н.Е., Харченко О.В., Непомнящих Г.И., Айдагулова С.В., Рыкова В.И., **Григорьева Э.В.** Молекулярные механизмы противоопухолевого эффекта Д-глюкуронил С5-эпимеразы в экспериментальной модели рака легкого in vivo // *Сибирский онкологический журнал.* 2010. Т. 2, Стр. 24-29.
21. Prudnikova T.Y., Mostovich L.A., Domanitskaya N.V., Pavlova T.V., Kashuba V.I., Zabarovsky E.R., **Grigorieva E.V.** Antiproliferative effect of D-glucuronyl C5-epimerase in human breast cancer cells // *Cancer Cell Int.* 2010. V. 10:27.
22. Rykova V.I., Ronichevskaya G.M., **Grigorieva E.V.** Effect of Total Proteoglycans on Cell Proliferation and Tumor Formation in Mice // *Int J Hum Genet.* 2009. V. 9(1). P. 31-37.
23. **Grigorieva E.**, Eshchenko T., Rykova V.I., Chernakov A., Zabarovsky E.R., Sidorov S.V. Decreased expression of human D-glycuronyl C5-epimerase in breast cancer // *Int J Cancer.* 2008. V. 122(5). P. 1172-1176.
24. Ещенко Т.Ю., Рыкова В.И., Чернаков А.Е., Сидоров С.В., **Григорьева Э.В.** Экспрессия различных видов протеогликанов в опухолях молочной железы человека // *Биохимия.* 2007. Т. 72. № 9. Стр. 1248-1254.
25. Рыкова В.И., **Григорьева Э.В.**, Черненко А.В., Ещенко Т.Ю., Дымшиц Г.М. Протеогликаны и рак молочной железы человека // *Бюлл Эксп Биол Мед.* 2007. Т. 144. № 3. Стр. 335-337.