

ОНКОСУПРЕССОРНЫЕ СВОЙСТВА РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ SEMG1 И SEMG2 В КЛЕТочНОЙ МОДЕЛИ КАРЦИНОМЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА MIA-PACA2

© 2019 г. О. Ю. Шувалов¹*, А. И. Кизенко¹, А. В. Петухов^{1,2}, С. Е. Парфеньев¹, О. А. Федорова¹, А. А. Дакс¹, Н. А. Барлев¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, 197341 Россия

*E-mail: oleg8988@mail.ru

Поступила в редакцию 15.04.2019 г.

После доработки 16.07.2019 г.

Принята к публикации 18.07.2019 г.

Раково-тестикулярные антигены – семеногелины 1 и 2 (SEMG1 и SEMG2 соответственно) – являются основными белками семенной жидкости человека и наряду с этим экспрессируются в злокачественных новообразованиях различного генезиса. Несмотря на то, что биологическая роль семеногелинов в репродуктивном процессе достаточно хорошо изучена, об их функциях в опухолевых клетках практически ничего не известно. В настоящем исследовании мы использовали клеточную модель рака поджелудочной железы человека – линию клеток Mia-Paca2 с сверхэкспрессией SEMG1 и SEMG2, а также контрольные клетки (Mia-Paca2, трансдуцированные соответствующим вектором). С использованием проточной цитометрии и флуоресцентного агента – дигидроэтидиума (DHE), детектирующего преимущественно супероксидный анион, мы показали, что сверхэкспрессия SEMG1 и SEMG2 способствует повышению уровня АФК. Кроме того, оба семеногелина повышали восприимчивость опухолевых клеток к широко применяемым химиотерапевтическим генотоксическим препаратам доксорубину и цисплатину. Полученные данные свидетельствуют об онкосупрессорных свойствах SEMG1 и SEMG2 в клеточной модели рака поджелудочной железы.

Ключевые слова: семеногелины 1 и 2, раково-тестикулярные антигены, карцинома поджелудочной железы, генотоксические препараты, доксорубин, цисплатин

DOI: 10.1134/S0041377119110099

Семеногелины 1 и 2 (SEMG1 и SEMG2 соответственно) относятся к аутосомным раково-тестикулярным антигенам (РТА) – группе белков, которые в норме экспрессируются в зародышевых клетках, но в то же время часто обнаруживаются в злокачественных новообразованиях различного генезиса. Они имеют 78% гомологии и являются основными белками семенной жидкости человека (Johnsson et al., 2006; Кизенко и др., 2018).

В семенной жидкости семеногелины и продукты их протеолиза выполняют ряд важных функций: регулируют подвижность (Lamirande et al., 2010) и созревание сперматозоидов (Lamirande et al., 2001), а также обеспечивают им антибактериальную защиту (Bourgeon et al., 2004).

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода, РТА – раково-тестикулярные антигены, 2DHE – дигидроэтидиум, SEMG1 – семеногелин 1, SEMG2 – семеногелин 2.

Кроме того, семеногелины обнаружены в различных злокачественных новообразованиях, включая карциному простаты (Canacci et al., 2011), мелкоклеточный рак легкого (Rodrigues et al., 2001), карциному почки (Zhang et al., 2014), а также при некоторых гемобластозах (Zhang et al., 2003). Единственная описанная в литературе биологическая функция семеногелинов в опухолях связана с раком простаты, при котором SEMG1, как было показано, является ко-активатором андрогенового рецептора (Canacci et al., 2011). Какие-либо другие данные относительно функциональной роли семеногелинов в опухолевых клетках в литературе отсутствуют.

Из литературных данных известно, что в контексте репродуктивного процесса семеногелины претворяют преждевременное созревание сперматозоидов за счет снижения количества АФК, что критично для процесса капацитации (Lamirande et al., 2010). Поэтому в настоящей работе мы решили оценить влияние сверхэкспрессии семеногелинов в клеточной модели

рака поджелудочной железы человека (Mia-Paca2) на уровень АФК и устойчивость опухолевых клеток к генотоксическим химиотерапевтическим препаратам.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные культуры. В работе использовали клеточные линии, полученные на основе карциномы поджелудочной железы человека Mia-Paca2, стабильно экспрессирующие SEMG1, SEMG2, меченные $3 \times$ Flag-эпитопом, а также контрольные клетки, экспрессирующие соответствующий вектор (любезно предоставлены Н. А. Барлевым). Клетки поддерживали на среде DMEM, содержащей 10% бычьей фетальной сыворотки, 2 мМ глутамин, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина в атмосфере 5% O_2 при температуре 37°C.

Вестерн-блот-анализ. Клетки лизировали буфером Лэммли (2% SDS, 60 мМ Tris-HCl (pH 6.8), 10% глицерина), после чего производили электрофорез в ПААГ с последующим переносом разделенных белков на PVDF-мембрану (ImmunBlot-PVDF, BioRad, США). Для иммуноблотинга использовали следующие моноклональные антитела (все от Sigma, США): anti-Flag (M21; 1 : 1000), anti- β -actin (A-2228; 1 : 1000) и вторичные антитела против мыши (A-9044; 1 : 10000).

Количественное определение АФК (преимущественно супероксидного анион-радикала). Для количественного анализа АФК использовали коммерческий тест-набор (Muse® oxidative stress kit, Millipore, США), содержащий в своем составе DHE, детектирующий преимущественно супероксидный анион-радикал в строгом соответствии с инструкцией фирмы-производителя. За 1 сут до анализа клетки (по 1.2×10^5) пассировали в трех повторностях для каждого варианта эксперимента. В день эксперимента клетки инкубировали в течение 30 мин с зондом дигидроэтидиумом (DHE), интенсивность флуоресценции которого главным образом пропорциональна количеству образованного супероксида. Далее клетки анализировали с помощью проточной цитометрии (Guava Easy Cite 8, Millipore, США). Полученные данные обрабатывали в программном обеспечении Microsoft Excel®.

Оценка восприимчивости клеток к генотоксическим препаратам. Использовали МТТ-тест (Shuvalov et al., 2018). Клетки (по 10000) рассаживали в 96-луночные планшеты. Для анализа использовали по 8 лунок. Спустя 1 сут среду клеток заменяли на среду, содержащую 0.5–2 мкМ доксорубицина (Teva) или 2–30 мкМ цисплатина (Teva, Нидерланды), и далее культивировали в течение 48 ч. Затем к ним добавляли 10 мкл раствора МТТ (тиазолол синий тетразолия бромид; ПанЭко, Россия) с концентрацией 5 мг/л и инкубировали в течение 4 ч, после чего удаляли среду и добавляли 50 мкл ДМСО для растворения продукта реакции (солей формазана). Результаты детектировали

с помощью планшетного ридера iMark (BioRad, США) при длине волны 595 нм и референтной длине волны 650 нм. Полученные данные обрабатывали в программном обеспечении Microsoft Excel.

Статистическая обработка. Использовали программное обеспечение Microsoft Excel, каждый эксперимент проводили в трех биологических повторностях. Результаты представлены в виде средних значений и их ошибки. Для расчета статистической значимости использован *t*-критерий Стьюдента, значимыми считали различия при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поскольку из литературных источников известно, что в сперматозоидах семеногелины могут выполнять функцию скавенджеров АФК (Lamirande et al., 2001), мы решили оценить их потенциальное влияние на уровень АФК в клеточной модели карциномы поджелудочной железы. Для этого мы использовали клеточные линии Mia-Paca2, стабильно экспрессирующие SEMG1 и SEMG2, а также контрольный вектор. Экспрессия SEMG1 и SEMG2 в клетках была подтверждена с использованием иммуноблотинга с соответствующими специфичными антителами (рис. 1а).

Для оценки уровня АФК мы использовали коммерческий тест-набор, содержащий в своем составе флуоресцирующий агент DHE, который детектирует преимущественно супероксид. С помощью проточной цитометрии (рис. 1б, в) мы обнаружили, что сверхэкспрессия обоих семеногелинов способствовала повышению интенсивности флуоресценции DHE в семеногелин-сверхэкспрессирующих клетках (142% для SEMG1 и 136% для SEMG2) относительно контрольных, то есть приводила к значительному увеличению АФК.

Хорошо известно, что индукция окислительного стресса является одним из механизмов действия противоопухолевых генотоксических препаратов (Deavall et al., 2012), поэтому в свете полученных нами данных мы заинтересовались, будет ли сверхэкспрессия семеногелинов оказывать какое-либо влияние на устойчивость изучаемой клеточной модели к широко применяемым в химиотерапии генотоксическим препаратам — доксорубину и цисплатину. Для этого мы использовали МТТ-тест.

Клетки подвергали действию цисплатина или доксорубина в течение 48 ч. Данные, приведенные на рис. 2а, б, свидетельствуют о том, что оба семеногелина вызывают значительное повышение восприимчивости исследуемых клеток как к цисплатину, так и к доксорубину. Так, гибель половины контрольных клеток наблюдали в присутствии 20 мкМ цисплатина в среде культивирования, в то время как 50%-ная гибель семеногелин-экспрессирующих клеток наступала при концентрации цисплатина менее 15 мкМ. В свою очередь доксорубин вызывал ги-

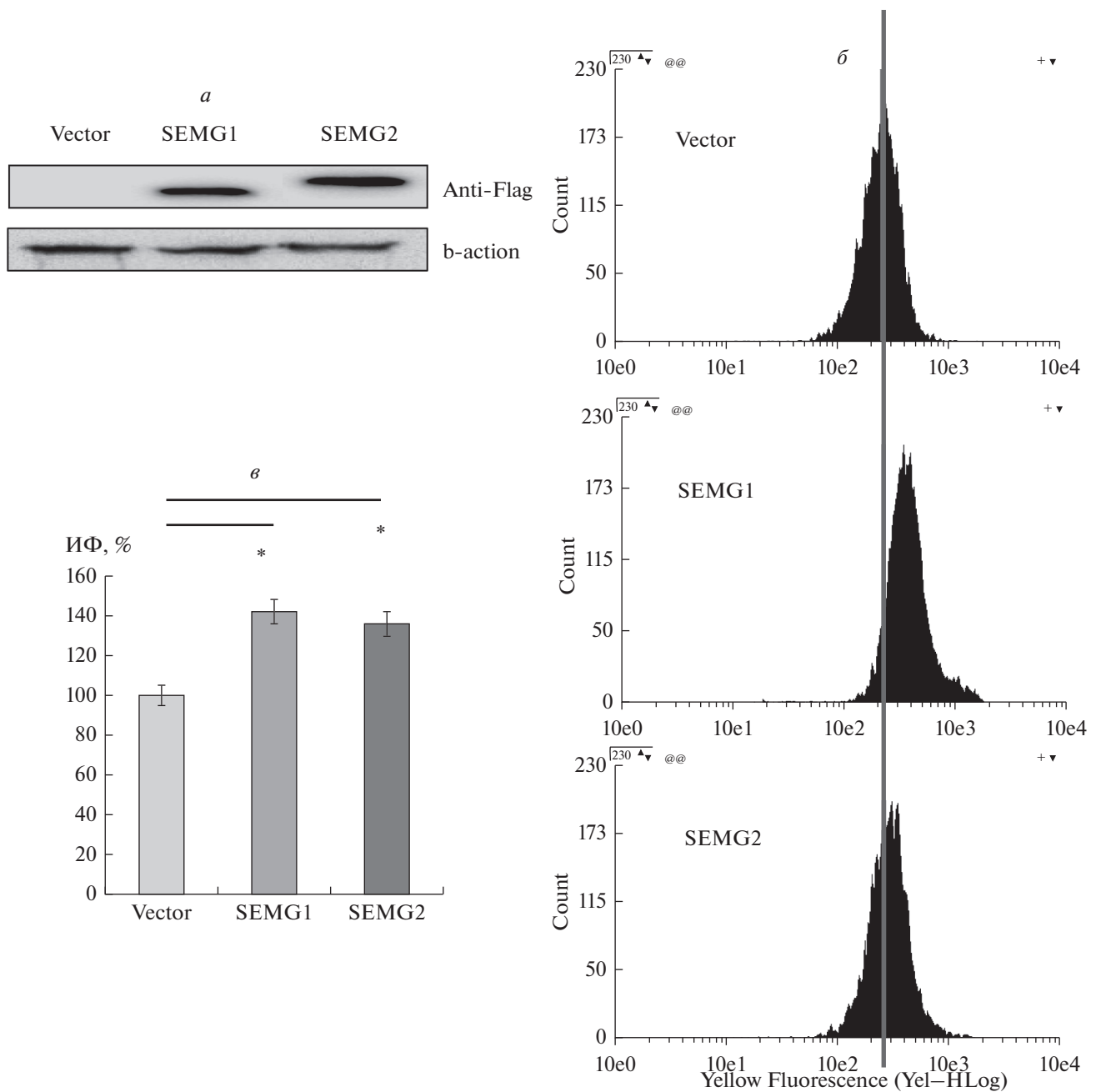


Рис. 1. Повышение уровня активных форм кислорода в клетках Mia-Paca, стабильно экспрессирующих семеногелин SEMG1 или SEMG2. *а* – Оверэкспрессия SEMG1 и SEMG2 по сравнению с контрольными клетками (Vector); иммуноблоттинг с применением антител к Flag-эпиту. Vector – клетки, трансдуцированные контрольным вектором LegoIG2. *б, в* – Распределение в клетках интенсивности флуоресценции (ИФ) зонда DHE, чувствительного преимущественно к супероксидному анион-радикалу и значения ИФ соответственно по данным проточной флуориметрии. (Различия с контролем достоверны при $*P < 0.05$.)

бель половины клеток при концентрации 1 мкМ для семеногелин-экспрессирующих клеток и только при концентрации 1.5 мкМ – для контрольных клеток.

Таким образом, можно заключить, что оверэкспрессия SEMG1 и SEMG2 в клетках карциномы поджелудочной железы человека Mia-Paca2 увели-

чивает уровень АФК и повышает восприимчивость клеток к генотоксическим препаратам.

ОБСУЖДЕНИЕ

Из данных литературы известно, что в рамках репродуктивного процесса одной из функций семено-

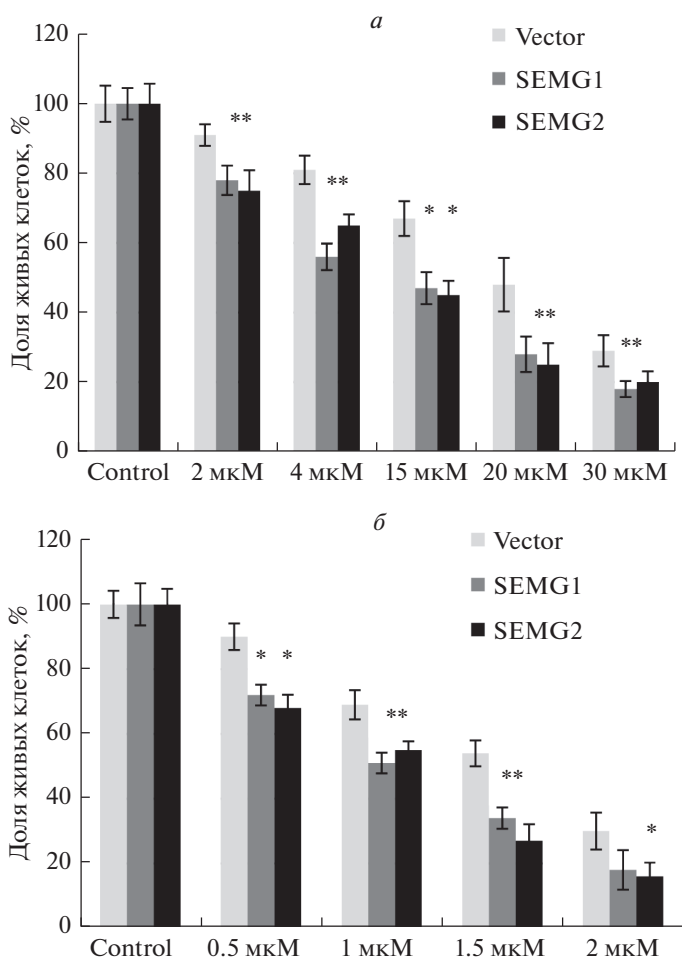


Рис. 2. Уменьшение жизнеспособности клеток Mia-Paca2, стабильно экспрессирующих SEMG1 или SEMG2, при действии цисплатина (а) и доxorубицина (б) в разных концентрациях. Данные МТТ-теста (10 мг/мл МТТ, 4 ч.). (Различия достоверны при $*P < 0.05$.)

изучаемой клеточной модели карциномы поджелудочной железы Mia-Paca2 семеногелины способствуют повышению уровня АФК. По-видимому, это связано с различным генезисом исследованных ранее (половые клетки) и изучаемых нами (карцинома поджелудочной железы) клеток.

Полученные нами результаты хорошо согласуются с семеногелин-опосредованным повышением гликолиза и мембранного потенциала митохондрий (согласно нашим собственным предварительным данным). Так, хорошо известно, что основным источником АФК в клетке является электрон-транспортная цепь митохондрий (Buffy et al., 2011). При этом основная продукция АФК (супероксидного аниона) осуществляется за счет одноэлектронного восстановления кислорода комплексом I (NADH/NAD⁺-редуктазой), главным образом при увеличении количества NADH (вследствие интенсификации гликолиза) и высоком значении мембранного потенциала, при котором возникает обратный поток электронов (Murphy, 2009). Таким образом, можно предположить, что наблюдаемое нами семеногелин-опосредованное увеличение интенсивностей гликолиза, дыхания и мембранного потенциала митохондрий (неопубликованные данные) приводит к увеличению продукции АФК в изучаемой клеточной модели карциномы поджелудочной железы.

В свою очередь, семеногелин-опосредованное повышение уровня АФК может иметь критическое значение для различных аспектов жизнедеятельности злокачественных клеток. Так, окислительный стресс является обычным следствием воздействия на клетки генотоксических препаратов из-за их способности усиливать генерацию АФК (Deavall et al., 2012). Принимая это во внимание, мы заинтересовались, влияют ли семеногелины на восприимчивость раковых клеток к генотоксическим препаратам. Мы показали, что оверэкспрессия SEMG1 и SEMG2 повышала восприимчивость клеток карциномы поджелудочной железы Mia-Paca2 к генотоксическим препаратам доxorубицину и цисплатину. Можно предположить, что семеногелин-ассоциированная продукция АФК способствует большей восприимчивости клеток к этим препаратам. Таким образом, совокупность наших данных свидетельствует об онкосупрессорных свойствах белков SEMG1 и SEMG2 в клеточной модели карциномы поджелудочной железы Mia-Paca2.

Из данных литературы известно, что экспрессия белков группы РТА, к которым относятся семеногелины, часто ассоциирована с агрессивными, низкодифференцируемыми опухолями (Prasad et al., 2004; Figueiredo et al., 2006; Velazques et al., 2007; Cjerstorff et al., 2015). Но есть и примеры положительной связи между экспрессией РТА и выживаемостью пациен-

гелинов является предупреждение преждевременной капацитации (созревания) сперматозоидов (Lamirande et al., 2001; Lamirande, Lamothe, 2010) за счет подавления АФК, генерация которых крайне важна для процесса капацитации. При этом было показано (Lamirande et al., 2001), что семеногелины выступают в роли скавенджеров АФК. Поскольку АФК являются важными и подчас критическими модуляторами пролиферации, инвазии и гибели опухолевых клеток, мы решили оценить влияние оверэкспрессии семеногелинов на уровень АФК в клеточной модели карциномы поджелудочной железы человека.

В противоречие имеющимся литературным данным об антиоксидантных свойствах семеногелинов в сперматозоидах (Lamirande et al., 2001), полученные нами результаты свидетельствуют о том, что в

тов (Freitas et al., 2013; Silva et al., 2017). Кроме того, в одной работе была продемонстрирована положительная связь между экспрессией SEMG2 и выживаемостью пациентов в случае рака простаты (Canacci et al., 2011), а в другой авторы (Zhang et al., 2014) наблюдали такую же корреляцию с SEMG1 при почечной карциноме.

Таким образом, можно заключить, что изучение биологических особенностей семеногелинов в опухолевых клетках необходимо для более полного понимания функциональной роли белков РТА в процессе новообразований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 17-75-10205).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Авторы не проводили экспериментов с участием животных или людей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кизенко А.И., Федорова, О.А., Дакс А.А., Петухов А.В., Барлев Н.А., Шувалов, О.Ю.* 2018. Раково-тестикулярные антигены – семеногелины 1 и 2: функции в репродуктивном процессе и онкогенезе. *Цитология*. 60(9) : 679–685. (*Kizenko A.I., Fedorova O.A., Daks A.A., Petukhov A.V., Barlev N.A., Shuvalov O.Yu.* 2018. Cancer-testicular antigens – semenogelins 1 and 2: functions in the reproductive process and oncogenesis. *Tsitologiya*. 60(9) : 679–685).
- Baffy G., Derdak Z., Robson S.C.* 2011. Mitochondrial recoupling: A novel therapeutic strategy for cancer? *BJC*. 105 : 469–474.
- Bourgeon F., Evrard B., Brillard-Bourdet M., Collet D., Jégou B., Pineau C.* 2004. Involvement of semenogelin-derived peptides in the antibacterial activity of human seminal plasma. *Biol. Reproduct*. 70 : 768–774.
- Canacci A.M., Izumi K., Zheng Y., Gordetsky J., Yao J.L., Miyamoto H.* 2011. Expression of semenogelins I and II and its prognostic significance in human prostate cancer. *Prostate*. 71 : 1108–1114.
- Deavall D.G., Martin E.A., Horner J.M., Roberts R.* 2012. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J. Toxicol*. 2012 : 645460. <https://doi.org/10.1155/2012/645460>
- Figueiredo D.L., Mamede R.C., Proto-Siqueira R., Neder L., Silva W.A., Zago M.A.* 2006. Expression of cancer testis antigens in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*. 28 : 614–619.
- Freitas M.R.P., Malheiros S.M.F., Stavale J.N., Biassi T.P., Zamuner F.T., de Souza Begnami M.D.F., Vettore A.L.* 2013. Expression of cancer/testis antigens is correlated with improved survival in glioblastoma. *Oncotarget*. 4 : 636–646.
- Gjerstorff M.F., Andersen M.H., Ditzel H.J.* 2015. Oncogenic cancer/testis antigens: Prime candidates for immunotherapy. *Oncotarget*. 6 : 15772–15787.
- Jonsson M., Lundwall Å., Malm J.* 2006. The semenogelins: proteins with functions beyond reproduction? *CMLS*. 63 : 2886–2888.
- Lamirande E., Lamothe G.* 2010. Levels of semenogelin in human spermatozoa decrease during capacitation: Involvement of reactive oxygen species and zinc. *Human Reproduction*. 25 : 1619–1630.
- Lamirande E., Yoshida K., Yoshiike M., Iwamoto T., Gagnon C.* 2001. Semenogelin, the main protein of semen coagulum, inhibits human sperm capacitation by interfering with the superoxide anion generated during this process. *J. Androl*. 22 : 672–679.
- Murphy M.P.* 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J*. 417 : 1–13.
- Prasad M.L., Jungbluth A.A., Patel S.G., Iversen K., Hoshaw-Woodard S., Busam K.J.* 2004. Expression and significance of cancer testis antigens in primary mucosal melanoma of the head and neck. *Head Neck*. 26 : 1053–1057.
- Rodrigues S.M., Schafe G.E., LeDoux J.E.* 2001. Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. *J. Neurosci*. 21 : 6889–6896.
- Shuvalov O., Kizenko A., Shakirova A., Fedorova O., Petukhov A., Aksenov N., Vasileva E., Daks A., Barlev N.* 2018. Nutlin sensitizes lung carcinoma cells to interferon-alpha treatment in MDM2-dependent but p53-independent manner. *BBRC*. 495 : 1233–1239.
- Silva V.L., Fonseca A.F., Fonseca M., Silva T.E., Coelho A.C., Kroll J.E., Souza S.J.* 2017. Genome-wide identification of cancer/testis genes and their association with prognosis in a pan-cancer analysis. *Oncotarget*. 8 : 92966–92977.
- Velazquez E.F., Jungbluth A.A., Yancovitz M., Grnjatic S., Adams S., O'Neill D., Pavlick A.* 2007. Expression of the cancer/testis antigen NY-ESO-1 in primary and metastatic malignant melanoma (MM)-correlation with prognostic factors. *Cancer Immun. Archive*. 7 : 1–7.
- Zhang Y., Wang Z., Liu H., Giles F.J., Lim S.H.* 2003. Pattern of gene expression and immune responses to Semenogelin 1 in chronic hematologic malignancies. *J. Immunother*. 26 : 461–467.
- Zhang S., Fang J., Zhang X., Qin C., Su S., Deng, Wang Z.* 2014. Seminal plasma protein in renal cell carcinoma: expression of semenogelin I is a predictor for cancer progression and prognosis. *Tumor Biol*. 35 : 9095–9100.

ONCOSUPPRESSOR PROPERTIES OF CANCER-TESTIS ANTIGENS, SEMG1 AND SEMG2, IN THE MODEL OF HUMAN PANCREATIC CARCINOMA MIA-PACA2

O. Y. Shuvalov^{a, *}, A. I. Kizenko^a, A. V. Petukhov^{a, b}, S. E. Parvenyev^a, O. A. Fedorova^a,
A. A. Daks^a, and N. A. Barlev^a

^a*Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia*

^b*Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, 197341 Russia*

**e-mail: oleg8988@mail.ru*

Cancer-testicular antigens – semenogelins 1 and 2 (SEMG1 and SEMG2, respectively) are the main proteins of human seminal fluid and are also expressed in malignant neoplasms of various genesis. Despite the fact that the biological role of semenogelins in the reproductive process is well understood, almost nothing is known about their functions in tumor cells. In the present study, we used a cell model of human pancreatic cancer – the Mia-Paca2 cell line with overexpression of SEMG1 or SEMG2, as well as control cells (Mia-Paca2 transduced with the corresponding vector). Using flow cytometry and a fluorescent agent – dihydroethidium (DHE), which predominantly detects superoxide anion. We showed that overexpression of SEMG1 and SEMG2 increases the level of ROS. In addition, both semenogelins increased the susceptibility of tumor cells to the widely used chemotherapeutic genotoxic drugs doxorubicin and cisplatin. The data obtained indicate the oncosuppressive properties of SEMG1 and SEMG2 in Mia-Paca2 cell model of pancreatic cancer.

Keywords: semenogelins 1 and 2, cancer-testis antigens, pancreatic carcinoma, reactive oxygen species, genotoxic drugs, doxorubicin, cisplatin