

УДК 577.29

СРАВНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ В 2D- И 3D-КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА В ПРИСУТСТВИИ ЛАМИНИНОВ 332 И 411

© 2019 г. Д. В. Мальцева^{a, b, *}, Ю. А. Макарова^{b, c}, А. Ю. Христинченко^a,
И. М. Цыпина^{a, d}, Е. А. Тоневицкий^a, С. А. Родин^{a, e}

^aОбщество с ограниченной ответственностью Научно-технический Центр “БиоКлиникум”, Москва, 115088 Россия

^bМосковский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Обнинск, 249036 Россия

^cИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^dНациональный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, 101000 Россия

^eDepartment of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet, Stockholm, SE 17177 Sweden

*e-mail: dmaltseva@gmail.com

Поступила в редакцию 28.08.2018 г.

После доработки 10.10.2018 г.

Принята к публикации 06.11.2018 г.

Необходимый этап эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ) – потеря клетками апикально-базальной поляризации, в формировании которой важную роль играет взаимодействие клеток с базальной мембраной и входящими в ее состав ламининами. Исследовано влияние перехода клеток линий колоректального рака из поляризованного состояния (2D) в состояние отсутствия апикально-базальной поляризации (3D) на экспрессию генов эпителиальных и мезенхимальных маркеров, а также проанализирована роль ламининов 332 и 411 (ЛМ-332 и ЛМ-411 соответственно) в этом процессе. Обнаружено, что три исследуемые клеточные линии: НТ-29, НСТ-116 и RKO – проявляют разную чувствительность к изменению условий культивирования (2D/3D) и присутствию ламининов. Одной из причин этого может быть различие в исходном состоянии клеток. Показано, что в исходном, 2D-состоянии, исследуемые линии находились на различных стадиях ЭМТ. В линии НТ-29 превалировал профиль экспрессии, характерный для эпителиальных клеток, в RKO – для мезенхимальных, а в НСТ-116 – для промежуточного состояния. Наиболее чувствительной к оказываемым воздействиям оказалась линия клеток НСТ-116. Критической перестройки профиля ЭМТ-генов не наблюдалось ни при переходе от 2D- к 3D-культивированию, ни при добавлении ламининов. Однако для обоих воздействий зарегистрированы изменения в экспрессии генов *SNAIL* и *ZEB1*, которые кодируют транскрипционные факторы, регулирующие процесс ЭМТ; причем экспрессия *SNAIL* усиливалась в ответ на обработку ламининами во всех трех клеточных линиях.

Ключевые слова: ламинин-332, ламинин-5, ламинин-411, ламинин-8, базальная мембрана, колоректальный рак, НТ-29, НСТ-116, RKO, эпителиально-мезенхимальная трансформация, апикально-базальная поляризация, *in vitro* модель, 2D-культура, 3D-культура

DOI: 10.1134/S0026898419020113

ВВЕДЕНИЕ

На первых этапах метастазирования происходит открепление опухолевых клеток от опухолевого узла [1]. Этот процесс сопровождается приобретением эпителиальными клетками опухоли мезенхимальных черт и носит название эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ).

Необходимый этап ЭМТ – потеря клетками апикально-базальной поляризации и нарушение адгезии к базальной мембране (БМ) [2]. Важными строительными блоками БМ служат ламинины – секретируемые гетеротримерные гликопротеины, состоящие из одной α -, одной β - и одной γ -цепи [3]. Название изоформы ламинина отражает состав входящих в него ламининовых цепей, напри-

Сокращения: БМ – базальная мембрана; ЛМ – ламинин при указании конкретной изоформы; ЭМТ – эпителиально-мезенхимальная трансформация.

мер ЛМ-411 содержит цепи $\alpha 4$, $\beta 1$ и $\gamma 1$. В различных тканях человека найдено 16 изоформ ламининов. Известно, что ламинины связываются с мембраной клетки, взаимодействуя сначала с галактозилсульфогликолипидами, а затем с рецепторами ламининов (дистрогликаном, интегринами, 67-кДа рецептором и др.), что приводит к формированию на поверхности мембраны клетки полимерного слоя ламининов [4]. Для поляризованных эпителиальных клеток характерно связывание с ламининами только с одной стороны клеток, например, на границе между клетками разных типов, или даже только с определенной областью мембраны клеток. Такая асимметричная локализация ламининов задает направление оси апикально-базальной полярности [4]. Интересным представляется вопрос, может ли равномерное покрытие мембраны ламинином способствовать деполяризации клетки и последующей ЭМТ.

Нами исследовано влияние перехода клеток линий колоректального рака из поляризованного состояния (2D-монослоя) в состояние отсутствия апикально-базальной полярности (3D-состояние) на экспрессию генов эпителиальных и мезенхимальных маркеров, а также роль ламининов в этом процессе.

Для моделирования поляризованного состояния клетки культивировали на поверхности пластикового планшета для адгезионных культур (2D-условия); для моделирования условий отсутствия апикально-базальной полярности клетки культивировали в состоянии висячей капли (3D-условия) в стандартной питательной среде, а также при добавлении ламинина. В таких условиях ламинин может равномерно покрыть плазматическую мембрану, что обеспечит передачу внутриклеточных сигналов со всех сторон клетки. Для исследования были выбраны две изоформы ламининов: ламинин-5 (ЛМ-332) и ламинин-8 (ЛМ-411). ЛМ-332 – мощный индуктор внутриклеточных сигналов [5], доминирует в эпителиальных тканях и входит в состав хемидесмосом [6]. Интересно, что в процессе ЭМТ уровень экспрессии гена $\alpha 3$ -цепи ламининов (*LAMA3*), по одним данным, снижается [7], по другим – повышается [8]. Предполагается, что ЛМ-332 в растворенном виде, не встроенный в БМ, выполняет роль ростового фактора [8]. Экспрессия ЛМ-411 более характерна для клеток мезенхимального происхождения, а в процессе ЭМТ его экспрессия возрастает [8]. Показано, что промоторы генов $\alpha 3$ - и $\alpha 4$ -цепей (*LAMA3* и *LAMA4* соответственно) содержат участки связывания таких важных ЭМТ-ассоциированных транскрипционных факторов, как *SNAI1/2* и *ZEB1/2* [8].

Анализ и сравнение ЭМТ-ассоциированных генов в 2D- и 3D-культурах опухолевых клеток важны для понимания молекулярных механиз-

мов метастазирования и роли ламининов в этом процессе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и материалы. В работе использованы следующие препараты: фосфатно-солевой буфер в модификации Дульбеко (DPBS), L-глутамин, 0,25%-ный раствор трипсин-EDTA с солями Хенкса (“ПанЭко”, Россия); питательная среда для культивирования клеток DMEM с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л), питательная среда для культивирования клеток McCoys, эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота (FBS), фосфатно-солевой буфер (PBS), 100× раствор антибиотиков PenStrep (“Gibco”, США); лизирующий буфер Qiazol Lysis Buffer (“Qiagen”, Германия); растворы ЛМ-332, ЛМ-511 и ЛМ-521 в концентрации 0,1 мг/мл (“BioLamina”, Швеция; или получены по описанной ранее методике [9]); набор для проведения обратной транскрипции MMLV RT kit, 5-кратная реакционная смесь для ПЦР в режиме реального времени qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”, Россия); олигодезоксирибонуклеотидные праймеры (“Синтол” и “ДНК-Синтез”, Россия); а также культуральные флаконы и 24-луночные планшеты фирмы “Corning” (США) и 96-луночные планшеты для формирования трехмерных сфероидов и агрегатов клеток Perfecta3D® Hanging Drop Plates фирмы “3D Biomatrix” (США).

Культивирование клеточных культур. Клеточные линии колоректальной аденокарциномы HT-29 и колоректальной карциномы HCT-116 культивировали в питательной среде McCoys с 10% FBS и антибиотиками – пенициллином и стрептомицином (1× PenStrep). Линию колоректальной карциномы RKO культивировали в питательной среде DMEM с 10% FBS, 1× PenStrep, 0,3 мг/мл L-глутамин. Замену среды приводили через 48 ч.

Культивирование клеточных культур в 3D-условиях, или в состоянии висячей капли, в питательной среде, содержащей или не содержащей ламинин, проводили следующим образом. Клетки каждой из клеточных линий растили во флаконах для адгезионных культур до достижения 80%-ной конfluence. Клетки обрабатывали раствором трипсин-EDTA, после чего трипсин ингибировали добавлением питательной среды, содержащей 10% FBS, и полученную суспензию центрифугировали в течение 3 мин при 1100 об./мин. После удаления супернатанта клетки ресуспендировали в свежей порции питательной среды и проводили их подсчет. Суспензию разводили таким образом, чтобы в 50 мкл содержалось 3×10^4 клеток, а концентрация ламинина (ЛМ-332 или ЛМ-411) составляла 0 или 10 мкг/мл. Приготовленные суспензии наносили в ячейки специального планшета

Perfecta3D® Hanging Drop Plate для формирования висючей капли. Клетки инкубировали в течение 24 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе, после чего промывали раствором DPBS и лизировали Qiazol Lysis Buffer. В качестве контроля, параллельно с рассеиванием клеток в ячейки Perfecta3D® Hanging Drop Plate, клетки помещали в лунки стандартного 24-луночного планшета для культивирования адгезионных клеточных культур (6×10^4 клеток на лунку в 500 мкл питательной среды без ламинина), где культивировали в состоянии адгезии на поверхности планшета в течение 24 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе. После удаления среды клетки промывали раствором DPBS, лизировали в Qiazol Lysis Buffer. Полученные лизаты замораживали при -20°C или немедленно приступали к выделению РНК.

Обратная транскрипция с ПРЦ (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени. Выделение, анализ качества и количества РНК проводили по описанной ранее методике [10]. Значения параметра качества RIN (RNA integrity number) выделенных образцов РНК находились в диапазоне 7.8–10 (максимальная величина RIN равна 10). Синтез кДНК с 1 мкг РНК в реакционной смеси проводили с использованием набора MMLV RT kit в соответствии с рекомендациями производителя. Экспрессию целевых генов оценивали методом ПЦР в режиме реального времени [11]; результаты обрабатывали по описанной ранее методике [12]. Референсные гены выбирали в соответствии с опубликованной методикой [13]. Для обеспечения возможности сравнения экспрессии генов между клеточными линиями в качестве референсных были выбраны гены *ACTB* и *EEF1A1*, экспрессия которых была сходна и стабильна для каждой из линий. Для исследования выбрали следующую панель генов-маркеров ЭМТ: *CDH1*, *DSP*, *SNAI1*, *SNAI2*, *ZEB1*, *TWIST*, *CDH2*, *MMP9*, *FN1* и *VIM* [14, 15], – а также гены α -цепей ламининов, *LAMA4* и *LAMA5*. Подбор последовательностей олигонуклеотидных праймеров, а также оценку их специфичности и эффективности реакции ПЦР проводили, как описано ранее [12]. Все эксперименты были поставлены в трех повторах в двух независимых экспериментах. Уровни экспрессии целевых генов нормировали по экспрессии референсных генов. Статистическую значимость результатов рассчитывали с использованием критерия Манна–Уитни. В соответствующих таблицах представлены значения изменения экспрессии тех генов, для которых $p < 0.05$ (кроме отдельно обозначенных случаев).

Анализ экспрессии генов с использованием микрочипов. Для клеточных линий HT-29 и HCT-116 проведено исследование профиля экспрессии генов с использованием микрочипов Gene Chip Human Transcriptome Array 2.0 (“Affymetrix”, США).

Выделение, анализ качества и количества РНК проводили, как описано ранее [10]. Для всех выделенных образцов РНК значения RIN превышали 9.5. Для синтеза кДНК брали 500 нг выделенной тотальной РНК. Все стадии подготовки образцов для гибридизации на микрочипы проводили в соответствии с протоколом производителя. Гибридизацию, промывание, окрашивание и сканирование микрочипов проводили по описанной ранее методике [16].

Оценка паттернов экспрессии генов в клеточных линиях колоректального рака. Обработку CEL-файлов, полученных при сканировании микрочипов в данной работе, а также CEL-файлы из общедоступной выборки микрочипов Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array (выборка GSE36133), полученной в рамках проекта Cancer Cell Line Encyclopedia [17], проводили с помощью программного пакета Transcriptome Analysis Console 2.0. Неаннотированные пробсеты (наборы проб на микрочипе) были исключены из анализа. При оценке экспрессии генов в качестве порогового уровня сигнала на микрочипе было выбрано значение 6.0 в логарифмической шкале Affymetrix. Гены, для которых уровень сигнала находился ниже этого уровня, рассматривались как неэкспрессирующиеся. Статистический анализ различий в экспрессии проводили с использованием непарного однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с пороговым уровнем значимости 0.05 без учета поправки Бенджамини–Хохберга на множественность сравнений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования выбрали три клеточные линии: HT-29, HCT-116 и RKO, – которые часто используются в качестве клеточных моделей колоректального рака.

Экспрессия генов, кодирующих цепи ламининов и их рецепторов

Используя данные проведенного нами анализа на микрочипах и также данные общедоступной выборки GSE36133 [17], мы проанализировали профиль экспрессии генов, кодирующих цепи ламининов и их рецепторов. Обнаружено, что только в клетках линии RKO экспрессируется $\alpha 1$ -цепь ламининов (*LAMA1*). Экспрессия $\alpha 3$ -цепи ламининов (*LAMA3*) по данным микрочипов не обнаружена в исследуемых линиях, но выявлена методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени в клетках HT-29 и HCT-116. Ген $\alpha 5$ -цепи ламининов (*LAMA5*) экспрессируется во всех исследуемых клеточных линиях, однако в RKO уровень этой мРНК в 4.3 и 1.9 раза ниже, чем в клетках HT-29 и HCT-116 соответственно. На микрочипах уровень сигнала для генов ламининовых цепей $\alpha 2$

и $\alpha 4$ находится ниже порогового значения для всех исследуемых линий, хотя слабый уровень их экспрессии обнаружен в клетках НСТ-116 методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Наибольший уровень мРНК гена *LAMA5* найден в клетках линии НТ-29. Таким образом, клеточные линии колоректально рака НТ-29, НСТ-116 и РКО в исходном состоянии отличаются по профилю экспрессии генов, кодирующих цепи ламининов. На основании проведенного анализа экспрессии генов ламининовых цепей нами выведены изоформы ламининов, которые могут продуцироваться в анализируемых клеточных линиях (табл. 1).

По результатам анализа экспрессии генов рецепторов ламининов на микрочипах выявлено, что клетки линий НТ-29 и НСТ-116 продуцируют сходный набор рецепторов, среди которых специфичные для ЛМ-411 интегрин $\alpha 3\beta 1$ и МСАМ и специфичный для ЛМ-332 интегрин $\alpha 6\beta 4$. Клетки линии РКО, в отличие от НТ-29 и НСТ-116, не продуцируют интегрины, специфичные к исследуемым изоформам ламининов. Интегрины рассматриваются в качестве основных рецепторов ламининов, которые связываются с ними с высокой аффинностью [8, 18], но в случае РКО за связывание с исследуемыми изоформами ламининов, по-видимому, ответственны только 67-кДа белок и α -дистрогликан.

Экспрессия генов, кодирующих эпителиальные и мезенхимальные маркеры

Исходные профили экспрессии генов, кодирующих эпителиальные и мезенхимальные маркеры, в исследуемых линиях колоректального рака, культивируемых в стандартных 2D-условиях, анализировали на микрочипах. В качестве основного набора эпителиальных и мезенхимальных

маркеров выбрали 50 генов, входящих в состав ПЦР-панели для оценки ЭМТ, Epithelial to Mesenchymal Transition RT² Profiler PCR Array (“Qiagen”). Также проанализирована экспрессия 35 генов, вовлеченных в межклеточную адгезию и down-регулируемых в процессе ЭМТ [19]. Экспрессия 10 маркеров, наиболее часто используемых в исследованиях ЭМТ, также проанализирована методом ОТ-ПЦР в реальном времени (табл. 2–4).

В линии РКО уровень экспрессии эпителиальных маркеров и гена *LAMA5* был значительно ниже, чем в двух других линиях. Особенно это относится к генам, которые кодируют белки, вовлеченные во все три вида межклеточной адгезии. По данным микрочипов, из 35 проанализированных генов межклеточной адгезии экспрессия 21 гена в клетках линии РКО была ниже порогового уровня. В линии НСТ-116 число генов межклеточной адгезии, экспрессирующихся ниже порогового уровня, равнялось 8, а в линии НТ-29 таких генов было только 4.

Что касается экспрессии генов мезенхимальных маркеров, то в линии РКО она была высокой, особенно гена фактора транскрипции *ZEB1*, значение нормированной экспрессии которого было на порядок выше, чем в НСТ-116. В линии НТ-29 экспрессия *ZEB1* не обнаружена (табл. 2–4). В линии НСТ-116, как и в линии РКО, уровень экспрессии некоторых других мезенхимальных маркеров также был существенно выше, чем в линии НТ-29 (табл. 2–4).

Таким образом, по паттернам экспрессии генов ЭМТ клетки РКО близки к мезенхимальному типу, НТ-29 – к эпителиальному типу, а НСТ-116 соответствовали промежуточному состоянию.

Таблица 1. Изоформы ламининов и их рецепторы, гены которых экспрессируются в клеточных линиях РКО, НТ-29 и НСТ-116

Клеточная линия	РКО*	НТ-29	НСТ-116
Изоформы ламининов	ЛМ-111 ЛМ-511	ЛМ-332 ЛМ-511	ЛМ-211 ЛМ-311 ЛМ-332 ЛМ-411 ЛМ-511
Интегрины – рецепторы ламининов		$\alpha 3\beta 1$ $\alpha 6\beta 1$ $\alpha 6\beta 4$	$\alpha 3\beta 1$ $\alpha 6\beta 1$ $\alpha 6\beta 4$
Другие рецепторы ламининов	67-кДа белок α -дистрогликан	67-кДа белок α -дистрогликан лютеран МСАМ	67-кДа белок α -дистрогликан лютеран МСАМ

* Для этой клеточной линии использованы также данные работы [17].

Таблица 2. Экспрессия генов эпителиальных и мезенхимальных маркеров в клетках линии НТ-29 при культивировании в 2D- и 3D-условиях

Ген	Affymetrix ^a	ОТ-ПЦР ^b		Изменение экспрессии, разы (ОТ-ПЦР) ^c	
	2D	2D	3D	3D	
	–	–	–	ЛМ-332	ЛМ-411
Эпителиальные маркеры					
<i>CDH1</i>	14.8	54 113	95 142	1.3 ± 0.2	–1.2 ± 0.1
<i>DSP</i>	12.6	93 027	82 924	3.1 ± 0.4	2.9 ± 0.3
Мезенхимальные маркеры					
<i>FN1</i>	4.6	0	0	0	0
<i>SNAI1</i>	4.7	268	270	4.7 ± 0.6	2.7 ± 0.4
<i>SNAI2</i>	3.9	0	0	0	0
<i>VIM</i>	4.5	67	0	0	0
<i>ZEB1</i>	5.5	0	0	0	0
<i>TWIST</i>	4.4	0	0	0	0
<i>MMP9</i>	6.3	0	0	0	0
<i>CDH2</i>	4.5	0	0	0	0
Ламинины					
<i>LAMA4</i>	4.7	0	0	0	0
<i>LAMA5</i>	8.2	57 712	69 254	1.5 ± 0.3	–2.1 ± 0.4

Примечание. Здесь и в табл. 3 и 4: ^a Значения приведены в логарифмической (\log_2) шкале по данным микрочипов Affymetrix HTA 2.0. ^b Значения нормированной экспрессии $\times 10^6$. ^c Изменение экспрессии рассчитывали относительно значений для соответствующих генов, полученных методом ОТ-ПЦР в реальном времени для 3D-условий культивирования в среде без ламинина (–). Отрицательное число означает, что экспрессия гена уменьшилась в соответствующее число раз.

Таблица 3. Экспрессия генов эпителиальных и мезенхимальных маркеров в клетках НСТ-116 при культивировании в 2D- и 3D-условиях

Ген	Affymetrix	ПЦР-РВ		Изменение экспрессии, разы (ОТ-ПЦР)	
	2D	2D	3D	3D	
	–	–	–	ЛМ-332	ЛМ-411
Эпителиальные маркеры					
<i>CDH1</i>	12.1	16 980	62 153	–2.3 ± 0.5	1.4 ± 0.2
<i>DSP</i>	13.7	480 569	315 098	1.4 ± 0.2	1.0 ± 0.1
Мезенхимальные маркеры					
<i>FN1</i>	6.5	1399	5586	–1.2 ± 0.1	2.4 ± 0.4
<i>SNAI1</i>	7.1	4656	2933	1.4 ± 0.2	2.6 ± 0.4
<i>SNAI2</i>	4.3	0	0	0	0
<i>VIM</i>	4.8	689	1620	–2.9 ± 0.4	1.6 ± 0.2
<i>ZEB1</i>	6.7	4747	3149	–1.9 ± 0.3	1.7 ± 0.3
<i>TWIST</i>	4.5	0	0	0	0
<i>MMP9</i>	6.4	0	0	0	0
<i>CDH2</i>	4.4	0	0	0	0
Ламинины					
<i>LAMA4</i>	4.7	39	123	–1.2 ± 0.2	3.2 ± 1.8*
<i>LAMA5</i>	8.2	57 712	111 868	–1.9 ± 0.4	2.0 ± 0.3

* $p > 0.15$.

Культивирование клеток в 3D-условиях

Условия равномерного покрытия ламинином мембраны клеток достигались культивированием клеток в специальных планшетах — в виде суспензии в питательной среде, содержащей растворенный ламинин, в состоянии висячей капли. Для создания суспензии клетки обрабатывали раствором трипсин-EDTA, который способствует нарушению межклеточных контактов.

Обнаружено, что чувствительность исследуемых клеток к нарушению межклеточных контактов и адгезии к поверхности различна. По сравнению с монослоем в 3D-культуре клеток НТ-29 и НСТ-116 выросла экспрессия гена эпителиального маркера Е-кадгерина (*CDH1*) (табл. 2). В клетках НСТ-116 также возросла экспрессия генов мезенхимальных маркеров: фибронектина (*FNI*) и виментина (*VIM*) — при небольшом снижении уровней экспрессии генов *SNAI1* и *ZEB1* соответствующих транскрипционных факторов (табл. 3). Для клеток RKO — линии с наиболее выраженным мезенхимальным профилем генной экспрессии — перенос в 3D-культуру не вызвал значимых изменений (т.е. не превышал 2 раза) в экспрессии маркеров ЭМТ (табл. 4). Стоит отметить только разнонаправленное изменение в экспрессии *SNAI1* и *ZEB1* — в 1.5 раза; при этом уровень экспрессии *ZEB1*, который в 2D-культуре более чем на порядок превышал *SNAI1*, увеличивался.

Изменение экспрессии генов-маркеров ЭМТ при культивировании клеток в 3D-условиях в присутствии ЛМ-332 или ЛМ-411

Добавление ламинина к 3D-культурам оказывало разный эффект на клеточные линии. В линии НТ-29, профиль генной экспрессии которой близок к эпителиальному, при добавлении ЛМ-332 наблюдался существенный рост экспрессии *DSP* — гена эпителиального маркера десмоплакина — и небольшое увеличение гена *LAMA5* (табл. 2); при обработке ЛМ-411 экспрессия *DSP* также возрастала, а *LAMA5* снижалась. Экспрессия мезенхимальных маркеров в обоих случаях не изменялась за исключением существенного роста экспрессии *SNAI1*.

При добавлении ЛМ-332 к линии НСТ-116 экспрессия эпителиальных маркеров менялась разнонаправленно, тогда как экспрессия мезенхимальных маркеров (за исключением *SNAI1*) и гена *LAMA5* снижалась (табл. 3). При обработке клеток ЛМ-411 экспрессия эпителиальных маркеров практически не изменялась, а уровень мезенхимальных маркеров и ламининовых цепей $\alpha 4$ и $\alpha 5$ возрастал.

Влияние обоих ламининов на экспрессию генов в клетках RKO было выражено слабее, чем в двух других линиях (табл. 4). Можно отметить небольшое усиление экспрессии мезенхимальных маркеров *VIM* и *SNAI1* в ответ на обработку каждым из ламининов, а также *LAMA5* в ответ на ЛМ-

Таблица 4. Экспрессия генов эпителиальных и мезенхимальных маркеров в клетках линии RKO при культивировании в 2D- и 3D-условиях

Ген	Affymetrix ^a	ПЦР-РВ ^b		Изменение экспрессии, разы (ОТ-ПЦР) ^c	
	2D	2D	3D	3D	
	—	—	—	ЛМ-332	ЛМ-411
Эпителиальные маркеры					
<i>CDH1</i>	4.0	0	0	0	0
<i>DSP</i>	7.0	9056	14202	-1.1 ± 0.1	-1.6 ± 0.2
Мезенхимальные маркеры					
<i>FNI</i>	4.2	0	0	0	0
<i>SNAI1</i>	4.1	1251	814	1.9 ± 0.2	1.5 ± 0.2
<i>SNAI2</i>	3.5	0	0	0	0
<i>VIM</i>	8.2	4635	5002	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.2
<i>ZEB1</i>	11.4	49402	74668	-1.1 ± 0.1	-1.1 ± 0.2
<i>TWIST</i>	3.3	0	0	0	0
<i>MMP9</i>	5.4	0	0	0	0
<i>CDH2</i>	4.1	0	0	0	0
Ламинины					
<i>LAMA4</i>	4.4	0	0	0	0
<i>LAMA5</i>	6.6	14093	11137	1.5 ± 0.1	-1.2 ± 0.2

332 и снижение экспрессии эпителиального маркера *DSP* в ответ на ЛМ-411.

Заметим, что при обработке как ЛМ-332, так и ЛМ-411 экспрессия гена *SNAI1* усиливалась, в той или иной степени, во всех трех клеточных линиях.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ламинины влияют на многие этапы развития злокачественных опухолей и резистентность опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам [6, 20]. Ранее показано, что экспрессия ламининов может служить прогностическим маркером при колоректальном раке [21], хотя молекулярный механизм вовлечения этих белков в развитие заболевания не изучен. Одно из возможных объяснений связано с участием ламининов в процессе ЭМТ [6, 22]. Так, имеются данные, что процесс ЭМТ сопряжен с изменением содержания изоформ ламининов в составе БМ. Кроме того, в ходе ЭМТ эпителиальные клетки неизбежно теряют апикально-базальную поляризацию [2], где важную роль играют ламинины [4]. На сегодня не выяснена причинно-следственная связь между ламининами и ЭМТ. Что первично в этом процессе: воздействие ламининов на клетки приводит к ЭМТ или, наоборот, вследствие ЭМТ изменяется экспрессия ламининов. Мы предположили, что равномерное покрытие мембраны клеток ламининами может способствовать потере апикально-базальной поляризации и стимулировать переход клеток колоректального рака в мезенхимальное состояние.

Оценка эпителиально-мезенхимального состояния клеток исследуемых линий колоректального рака. В связи с тем, что влияние ламининов на клетки, находящиеся на разных этапах ЭМТ, может проявляться по-разному, мы оценили паттерны экспрессии генов, ассоциированных с процессом ЭМТ, в трех линиях клеток колоректального рака.

В результате проведенного анализа показано, что все исследуемые клеточные линии в стандартных 2D-условиях культивирования экспрессируют гены, ассоциированные как с эпителиальным, так и с мезенхимальным фенотипом, хотя паттерны различаются между клетками. На основании уровня представленности этих маркеров можно сделать вывод, что исследуемые клеточные линии находятся на разных стадиях ЭМТ. По степени выраженности эпителиального фенотипа исследуемые линии можно расположить в следующем порядке: НТ-29 > НСТ-116 > RKO, — то есть, клетки НТ-29 ближе к эпителиальному состоянию, НСТ-116 к гибриднему эпителиальному состоянию, а RKO к гибриднему мезенхимальному.

Профили экспрессии генов, кодирующих ламинины и их рецепторы. Ранее показано, что в процессе ЭМТ может происходить падение экспрессии *LAMA5* или даже переключение экспрессии с

LAMA5 на *LAMA4* [8]. Нами обнаружено, что мРНК *LAMA5* экспрессируется во всех исследованных линиях клеток на близком уровне. мРНК *LAMA4* детектировали только в клетках НСТ-116, причем ее уровень был на два порядка ниже, чем мРНК *LAMA5*. Недавно показано [7], что при переходе от клеток с полностью эпителиальными характеристиками к клеткам, находящимся в гибридном состоянии, происходит значительное падение экспрессии *LAMA3*. Мы проанализировали экспрессию этого гена и обнаружили мРНК *LAMA3* только в клетках НТ-29 и НСТ-116, причем на одинаковом уровне.

С процессом ЭМТ также связывают снижение экспрессии ламининсвязывающих интегринов и, как следствие, уменьшение адгезии к БМ [19]. Среди исследуемых линий, только в клетках RKO наблюдалось отсутствие экспрессии ламининсвязывающих интегринов. Таким образом, на основании экспрессии генов ламининов и их рецепторов можно предположить, что из трех исследуемых линий колоректального рака клетки НТ-29 обладают наиболее эпителиальным фенотипом, RKO — наиболее мезенхимальным, а НСТ-116 находятся в состоянии, которое можно назвать промежуточным между НТ-29 и RKO.

Экспрессии генов-маркеров ЭМТ при культивировании клеток в 3D-условиях. Как показано, клетки трех исследуемых линий колоректального рака обладают разной чувствительностью к переходу от стандартного 2D-культивирования к 3D-культуре. Наиболее значимые изменения экспрессии генов-маркеров обнаружены в линии НСТ-116, в том числе снижение экспрессии генов *SNAI1* и *ZEB1*, кодирующих транскрипционные факторы-регуляторы ЭМТ. В клетках линии RKO наблюдалось разнонаправленное изменение экспрессии этих транскрипционных факторов. Так, уровень мРНК *ZEB1*, который в 2D-условиях более чем на порядок превышал таковой для мРНК *SNAI1*, продолжал расти, а мРНК *SNAI1* — снижался. Таким образом, общих для всех трех линий тенденций изменения профиля экспрессии ЭМТ-ассоциированных генов в результате перехода от 2D- к 3D-условиям культивирования не выявлено. Не произошло и нивелирования различий между клетками — по степени выраженности эпителиального фенотипа в 3D-условиях исследуемые линии можно расположить в том же порядке, как и в 2D-условиях: НТ-29 > НСТ-116 > RKO.

Наиболее чувствительной к действию ламининов оказалась линия НСТ-116. Вероятно, это связано с тем, что экспрессионный фенотип НСТ-116 соответствует переходному ЭМТ-состоянию — неустойчивому и поэтому более чувствительному к воздействию внешних факторов. Интересно, что обработка ЛМ-332 приводила к снижению экспрессии почти всех мезенхимальных марке-

ров, экспрессируемых этой линией, тогда как ЛМ-411, напротив, стимулировал их экспрессию. Таким образом, очевидно, что сигналы, передаваемые при связывании рецепторов на поверхности клеток НСТ-116 с ЛМ-332 и ЛМ-411, различаются. Такая избирательность клеточного ответа, по-видимому, обеспечивается экспрессией клетками НСТ-116 интегринов, специфичных к исследуемым изоформам ламининов. Среди мезенхимальных маркеров отметим изменение экспрессии регуляторов процесса ЭМТ – генов транскрипционных факторов. Так, в присутствии ЛМ-332 значительно снижался уровень экспрессии *ZEB1*, в том числе по сравнению с 2D-условиями. В присутствии ЛМ-411 экспрессия гена другого транскрипционного фактора, *SNAIL*, несмотря на снижение при переходе от 2D- к 3D-условиям культивирования, усиливалась и превысила уровень 2D-условий.

В клетках РКО влияние ЛМ-332 и ЛМ-411 было менее выраженным, чем в клетках двух других линий, что может быть связано с отсутствием в РКО экспрессии генов ламининспецифичных интегринов. При сравнении с 2D-условиями культивирования значимое различие детектировали только для гена мезенхимального маркера виментина.

В клетках НТ-29, линии с близким к эпителиальному фенотипом, в ответ на обработку ламининами значимо по сравнению с 2D-условиями изменялась экспрессия только двух генов – *SNAIL* и *DSP*.

Интересно, что единственным геном, экспрессия которого изменилась (возросла) во всех клеточных линиях при обработке как ЛМ-322, так и ЛМ-411, оказался *SNAIL*. Следовательно, во всех изучаемых линиях колоректального рака может реализовываться универсальный механизм активации *SNAIL* в присутствии ламининов. Но это уже предмет дальнейших исследований.

Таким образом, клетки исследуемых линий колоректального рака: НТ-29, НСТ-116 и РКО – изначально находятся на различных стадиях ЭМТ и обладают разной чувствительностью к изменению условий культивирования (2D/3D). Однако переход к 3D-культивированию не приводит к унификации клеток. Наоборот, различие профилей экспрессии ЭМТ-генов между линиями сохранилось. Интересно, что для всех исследуемых клеточных линий степень влияния ламининов на экспрессию ЭМТ-генов была сравнима с влиянием стресса, вызванного потерей клетками адгезии к поверхности и межклеточных контактов (переходом 2D → 3D). Направление этого влияния в исследуемых линиях различалось, что, по-видимому, обусловлено разницей не только в исходном состоянии клеток, но и в паттернах экспрессии рецепторов ламининов. По сравнению с профилем экспрессии в 2D-условиях критической

перестройки профиля ЭМТ-генов не наблюдали ни в одном из случаев, за исключением изменений в экспрессии генов *SNAIL* и *ZEB1*. Возможно, при увеличении длительности наблюдения за клетками при переходе 2D → 3D, например до 48 или 72 ч, удастся оценить вторичный ответ клеток – на изменение экспрессии ЭМТ-ассоциированных транскрипционных факторов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 17-14-01338).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Samatov T.R., Tonevitsky A.G., Schumacher U. (2013) Epithelial-mesenchymal transition: focus on metastatic cascade, alternative splicing, non-coding RNAs and modulating compounds. *Mol. Cancer*. **12**, 107.
- Lamouille S., Xu J., Derynck R. (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 178–196.
- Domogatskaya A., Rodin S., Tryggvason K. (2012) Functional diversity of laminins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 523–553.
- Matlin K.S., Myllymäki S.-M., Manninen A. (2017) Laminins in epithelial cell polarization: old questions in search of new answers. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* a027920.
- Marinkovich M.P. (2007) Tumour microenvironment: laminin 332 in squamous-cell carcinoma. *Nat. Rev. Cancer*. **7**, 370–380.
- Yurchenco P.D. (2011) Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a004911–a004911.
- Pastushenko I., Brisebarre A., Sifrim A., Fioramonti M., Revenco T., Boumahdi S., Van Keymeulen A., Brown D., Moers V., Lemaire S., De Clercq S., Minguijón E., Balsat C., Sokolow Y., Dubois C., De Cock F., Scozzaro S., Sopena F., Lanas A., D’haen N., Salmon I., Marine J.-C., Voet Th., Sotiropoulou P.A., Blanpain C. (2018) Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature*. **556**, 463–468.
- Мальцева Д.В., Родин С.А. (2018) Ламинины и метастазирование опухолей. *Молекуляр. биология*. **52**, 411–434.
- Doi M., Thyboll J., Kortessmaa J., Jansson K., Iivanainen A., Parvardeh M., Timpl R., Hedin U., Swedenborg J., Tryggvason K. (2002) Recombinant human laminin-10 (alpha5beta1gamma1). Production, purification, and migration-promoting activity on vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 12741–12748.
- Khaustova N.A., Maltseva D.V., Oliveira-Ferrer L., Stürken C., Milde-Langosch K., Makarova J.A., Rodin S., Schumacher U., Tonevitsky A.G. (2017) Selectin-independent adhesion during ovarian cancer metastasis. *Biochimie*. **142**, 197–206.
- Maltseva D.V., Krainova N.A., Khaustova N.A., Nikulin S. V., Tonevitskaya S.A., Poloznikov A.A. (2017) Biodistribution of viscumin after subcutaneous injection to mice and *in vitro* modeling of endoplasmic reticulum stress. *Bull. Exp. Biol. Med.* **163**, 451–455.

12. Krainova N.A., Khaustova N.A., Makeeva D.S., Fedotov N.N., Gudim E.A., Ryabenko E.A., Shkurnikov M.U., Galatenko V.V., Sakharov D.A., Maltseva D.V. (2013) Evaluation of potential reference genes for qRT-PCR data normalization in HeLa cells. *Appl. Biochem. Microbiol.* **49**, 743–749.
13. Maltseva D.V., Khaustova N.A., Fedotov N.N., Matveeva E.O., Lebedev A.E., Shkurnikov M.U., Galatenko V.V., Schumacher U., Tonevitsky A.G. (2013) High-throughput identification of reference genes for research and clinical RT-qPCR analysis of breast cancer samples. *J. Clin. Bioinform.* **3**, 13.
14. Nieto M.A., Huang R.Y.-J., Jackson R.A., Thiery J.P. (2016) EMT: 2016. *Cell.* **166**, 21–45.
15. Nikulin S.V., Raigorodskaya M.P., Poloznikov A.A., Zakharova G.S., Schumacher U., Wicklein D., Stürken C., Riecken K., Fomicheva K.A., Alekseev B.Y., Shkurnikov M.Y. (2018) Role of IGFBP6 protein in the regulation of epithelial-mesenchymal transition genes. *Bull. Exp. Biol. Med.* **164**, 650–654.
16. Kudriaeva A., Galatenko V., Maltseva D., Khaustova N., Kuzina E., Tonevitsky A., Gabibov A., Belogurov A. (2017) The transcriptome of type I murine astrocytes under interferon-gamma exposure and remyelination stimulus. *Molecules.* **22**, 808.
17. Barretina J., Caponigro G., Stransky N., Venkatesan K., Margolin A.A., Kim S., Wilson C.J., Lehár J., Kryukov G.V., Sonkin D., Reddy A., Liu M., Murray L., Berger M.F., Monahan J.E., Morais P., Meltzer J., Korjawa A., Jané-Valbuena J., Mapa F.A., Thibault J., Bric-Furlong E., Raman P., Shipway A., Engels I.H., Cheng J., Yu G.K., Yu J., Aspesi P. Jr., de Silva M., Jagtap K., Jones M.D., Wang L., Hatton C., Palesscandolo E., Gupta S., Mahan S., Sougnez C., Onofrio R.C., Liefeld T., MacConaill L., Winckler W., Reich M., Li N., Mesirov J.P., Gabriel S.B., Getz G., Ardlie K., Chan V., Myer V.E., Weber B.L., Porter J., Warmuth M., Finan P., Harris J.L., Meyerson M., Golub T.R., Morrissey M.P., Sellers W.R., Schlegel R., Garraway L.A. (2012) The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature.* **483**, 603–607.
18. Ramovs V., Te Molder L., Sonnenberg A. (2017) The opposing roles of laminin-binding integrins in cancer. *Matrix Biol.* **57–58**, 213–243.
19. Thomson S., Petti F., Sujka-Kwok I., Mercado P., Bean J., Monaghan M., Seymour S.L., Argast G.M., Epstein D.M., Haley J.D. (2011) A systems view of epithelial–mesenchymal transition signaling states. *Clin. Exp. Metastasis.* **28**, 137–155.
20. Qin Y., Rodin S., Simonson O.E., Hollande F. (2017) Laminins and cancer stem cells: partners in crime? *Semin. Cancer Biol.* **45**, 3–12.
21. Galatenko V.V., Maltseva D.V., Galatenko A.V., Rodin S., Tonevitsky A.G. (2018) Cumulative prognostic power of laminin genes in colorectal cancer. *BMC Med. Genomics.* **11**, 9.
22. Rodin S.A., Maltseva D.V. (2017) Laminins in colorectal cancer: expression, function, prognostic power and molecular mechanisms. *Res. Pract. Med. J.* **4**, 73–78.

EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION MARKERS IN 2D AND 3D COLON CANCER CELL CULTURES IN THE PRESENCE OF LAMININ 332 AND 411

D. V. Maltseva^{1,2,*}, J. A. Makarova^{2,3}, A. Yu. Khristichenko¹, I. M. Tsygina^{1,4}, E. A. Tonevitsky¹, S. A. Rodin^{1,5}

¹*SRC Bioclinicum, Moscow, 115088 Russia*

²*Hertsen Moscow Oncology Research Center, Branch of Federal State Budgetary Institution National Medical Research Radiological Center, the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, 249036 Russia*

³*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

⁴*National Research University Higher School of Economics, Moscow, 101000 Russia*

⁵*Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet, Scheelesväg 2, Stockholm, SE 17177 Sweden*

*e-mail: dmaltseva@gmail.com

The loss of apical-basal cell polarity is a necessary stage of the epithelial-mesenchymal transformation (EMT). Polarized epithelial cells interact with the basal membrane (BM) and, in particular, with laminins, the major components of BM. Here, we examined the effect of the transition of colon cancer cells from 2D polarized state to non-polarized 3D state on the expression of EMT associated genes, as well as the role of laminins 332 and 411 (LM-332 and LM-411) in this process. The three studied cell lines, HT-29, HCT-116 and RKO, were found to have different sensitivity to cultivation conditions (2D to 3D changes) and to addition of laminins. One of the possible reasons for this may be a difference in the initial 2D state of the cells. In particular, it was shown that the cell lines were at different EMT stages. HT-29 exhibited more epithelial expression profile, RKO was more mesenchymal, and HCT-116 was in an intermediate state. The most laminin-sensitive cell line was HCT-116. The magnitude and the specificity of cell response to LM-332 and LM-411 depended on the expression pattern of laminins' receptors. EMT gene expression profile was not substantially changed neither during the transition from 2D to 3D state, nor the presence of laminins' isoforms. However, we detected changes in expression of *SNAIL* and *ZEB1* genes encoding transcription factors that control the EMT process. Notably, in all three studied cell lines, the expression of *SNAIL* was enhanced in response to laminin treatment.

Keywords: colon cancer, HT-29, HCT-116, RKO, laminin 332, laminin-5, laminin 411, laminin-8, epithelial-mesenchymal transformation, apical-basal cell polarity, basal membrane, *in vitro* model, 2D culture, 3D culture