

ПОДАВЛЕНИЕ СИНТЕЗА ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА HNF4 α В КЛЕТКАХ ПРОТОВОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ВЫЗЫВАЕТ РАЗНОНАПРАВЛЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА

Горев А.Д.¹, Чесноков М.С.¹, Лазаревич Н.Л.¹

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, Москва, e-mail: lazarevich.nl@gmail.com

Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы (ПАКПЖ) – крайне агрессивный тип злокачественных опухолей поджелудочной железы, диагностируемый на поздних стадиях и устойчивый к современным схемам противоопухолевой терапии. Исследование молекулярных механизмов развития ПАКПЖ необходимо для разработки новых эффективных подходов к диагностике и терапии этой формы опухолей. Транскрипционный фактор HNF4 α является важным регулятором развития поджелудочной железы и ряда других органов. В клетках печени, кишечника и почки HNF4 α является опухолевым супрессором, однако его роль в развитии ПАКПЖ практически не исследована. В работе исследованы эффекты, вызванные подавлением синтеза HNF4 α в умереннодифференцированных клетках ПАКПЖ человека AsPC1 с помощью метода РНК-интерференции. Подавление синтеза HNF4 α приводит к значительному повышению способности клеток к направленной миграции и резкому снижению их пролиферативного и колониобразующего потенциала. Эти разнонаправленные изменения клеточных свойств сопровождаются изменениями экспрессии генов E- и N-кадгерина, характерными для эпителиально-мезенхимального перехода, а также активацией экспрессии гена *CDKN1A*. Этот ген является прямой мишенью HNF4 α и кодирует белок p21^{CIP1/WAF1}, являющийся регулятором клеточного цикла и структуры актинового цитоскелета. Полученные результаты указывают на то, что HNF4 α в клетках ПАКПЖ может обладать не только опухолесупрессорными, но и проопухолевыми функциями, а возможным механизмом его влияния на клеточные характеристики является регуляция экспрессии белка p21^{CIP1/WAF1}.

Ключевые слова: протоковая аденокарцинома поджелудочной железы, HNF4 α , злокачественный потенциал, p21^{CIP1/WAF1}.

REPRESSION OF TRANSCRIPTION FACTOR HNF4 α SYNTHESIS IN HUMAN PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA CELLS RESULTS IN OPPOSITELY DIRECTED CHANGES OF THEIR MALIGNANT POTENTIAL

Gorev A.D.¹, Chesnokov M.S.¹, Lazarevich N.L.¹

¹FSBSI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, e-mail: lazarevich.nl@gmail.com

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is an extremely aggressive type of malignant pancreatic tumors that is diagnosed at advanced stages and resistant to modern strategies of anti-tumor therapy. Investigation of the molecular mechanisms of PDAC progression is essential for the development of new efficient diagnostic and therapeutic approaches for this tumor. Transcription factor HNF4 α is an important development regulator of pancreas and other organs. HNF4 α acts as a tumor suppressor in liver, intestine and kidney cells, but its role in PDAC development is still poorly understood. Present study investigates the effects caused by HNF4 α synthesis repression in moderately differentiated human PDAC cells AsPC1 via RNA-interference approach. HNF4 α synthesis repression results in significant increase in cells' directional migration ability and drastic decrease in their proliferative and clonogenic potential. These divergent changes of cell properties are accompanied by E- and N-cadherin expression changes attributable to epithelial-mesenchymal transition process and upregulation of *CDKN1A* gene expression. This gene is a direct HNF4 α target and encodes p21^{CIP1/WAF1} protein that regulates cell cycle and actin cytoskeleton architecture. Obtained results indicate that HNF4 α in PDAC cells can act not only as a tumor suppressor but also as a prooncogenic regulator, and that the regulation of p21^{CIP1/WAF1} expression is the possible mechanism of regulation of cell properties by HNF4 α .

Keywords: pancreatic ductal adenocarcinoma, HNF4 α , malignant potential, p21^{CIP1/WAF1}.

Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы (ПАКПЖ) является самым

распространенным типом злокачественных опухолей поджелудочной железы (ПЖ) и отличается крайне неблагоприятным прогнозом. 5-летняя выживаемость пациентов с ПАКПЖ не превышает 8%, что связано как с высокой агрессивностью опухоли (быстрая прогрессия, раннее метастазирование), так и с низкой эффективностью современных методов диагностики и терапии (позднее диагностирование из-за отсутствия явных симптомов, отсутствие специфических биомаркеров, устойчивость к химиотерапии) [2].

ПАКПЖ возникает из протоковых клеток поджелудочной железы, которые способны к контролируемой дедифференцировке с последующей пролиферацией и трансдифференцировкой в другие типы панкреатических клеток, что необходимо для регенерации в случае повреждения органа [5]. Нарушения регуляции дифференцировки протоковых клеток могут привести к их опухолевой трансформации и развитию ПАКПЖ. Дифференцировка клеток ПЖ контролируется рядом тканеспецифических транскрипционных факторов (ТФ), наиболее значимыми из которых являются PDX1, PTF1A и белки группы гепатоцитарных ядерных факторов (HNF), состоящей из пяти семейств: HNF1, FOXA, HNF4, ONECUT и C/EBP [1; 14]. Эти ТФ способны к взаимной регуляции, в результате чего образуется комплексная сеть, контролирующая транскрипцию тканеспецифических генов. Фактор HNF4 α является одним из центральных регуляторов этой сети. В норме он контролирует развитие и дифференцировку печени, поджелудочной железы и кишечника; его экспрессия характерна также для эпителия почки, желудка и семенников [1; 12]. Транскрипция гена *HNF4A* контролируется независимо регулируемыми промоторами P1 и P2, определяющими экспрессию двух групп изоформ (HNF4 α P1 – изоформы α 1- α 6, HNF4 α P2 – изоформы α 7- α 12) [1; 13]. Эти группы обладают разными трансактивационными свойствами, а спектры их экспрессии характеризуются тканеспецифичностью. В нормальной поджелудочной железе преобладает экспрессия изоформ HNF4 α P2 [12].

В большинстве тканей, для которых характерна экспрессия HNF4 α , он играет роль опухолевого супрессора. Подавление экспрессии HNF4 α является ключевым событием в прогрессии гепатоцеллюлярной карциномы, а его экзогенная реэкспрессия приводит к реверсии злокачественного фенотипа этой опухоли [9]. HNF4 α оказывает антипролиферативное действие на эпителиальные клетки кишечника и почки [6; 10]. Общий уровень экспрессии HNF4 α повышен в панкреатических неоплазиях (предопухолевых образованиях ПЖ) и падает в ткани низкодифференцированной ПАКПЖ [8], однако изменения экспрессии изоформ HNF4 α в ПАКПЖ и его влияние на свойства и прогрессию этого типа опухолей на сегодняшний день практически не изучены. Ранее нами было показано, что экзогенная экспрессия HNF4 α вызывает частичную редифференцировку низкодифференцированных клеток ПАКПЖ и снижает их злокачественный потенциал, в то

время как подавление его синтеза в высокодифференцированных клетках приводит к усилению выраженности злокачественного фенотипа [3; 4]. Эти результаты позволили нам выдвинуть предположение о том, что HNF4 α в клетках ПАКПЖ является опухолевым супрессором.

В данной работе исследовались эффекты, вызванные подавлением экспрессии HNF4 α в умереннодифференцированных клетках ПАКПЖ AsPC1. Мы продемонстрировали, что такое подавление может приводить к разнонаправленным изменениям, свидетельствующим о наличии у HNF4 α как опухолесупрессорных, так и не описанных ранее проопухолевых функций.

Материалы и методы

Клеточные линии

В работе использовали линию протоковой аденокарциномы поджелудочной железы человека AsPC1 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных НИИ Цитологии РАН, Россия). Для упаковки лентивирусных конструкций была использована линия пакующих клеток HEK293T (Invitrogen, США).

Клетки обеих линий культивировали в среде RPMI-1640 (Gibco, США) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (Biological Industries, Израиль), 300 мг/л глутамина («ПанЭко», Россия) и 10 мг/л антибиотика ципрофлоксацина. Культивирование проводили в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37 °C. Приблизительно раз в 3-5 дней клетки обрабатывали трипсином и пересевали.

Плазмидные векторы

В работе был использован набор из пяти плазмид на основе лентивирусного вектора pLKO-1 серии «MISSION shRNA Plasmid DNA» SHDNA-NM_000457, а также контрольный вектор pLKO-1 (Sigma, США). Векторы MISSION кодировали пять вариантов малых шпилечных РНК (мшРНК), комплементарных последовательности мРНК HNF4 α . Все использованные плазмиды экспрессировали ген устойчивости к пурамицину. Для упаковки вирусных частиц использовали систему ViraPower (Invitrogen, США), включающую векторы pLP1, pLP2 и pCMV-VSVg.

Лентивирусная инфекция клеток

Трансфекцию клеток HEK293T векторами pLP1, pLP2, pCMV-VSVg и одним из векторов MISSION проводили при помощи стандартного кальций-фосфатного метода. Собранную на третий день культуральную среду с вирусом фильтровали через 0,45-мкм фильтр и инкубировали в ней клетки AsPC1. Через 48 часов в культуральную среду добавляли антибиотик пурамицин (2 мкг/мл) и проводили селекцию в течение 8 дней.

ОТ-ПЦР-анализ уровней экспрессии генов

Суммарную РНК выделяли из клеток при помощи набора RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием случайных гексамерных олигонуклеотидов («Синтол», Россия) и обратной транскриптазы MMLV-RT (Promega, США).

Для определения уровней экспрессии генов применяли методы полуколичественного и количественного ПЦР. Список исследованных генов, последовательности использованных для ПЦР праймеров («Синтол», Россия) и оптимизированные температуры отжига праймеров приведены в таблице. Для нормализации результатов ПЦР-анализа использовали уровень экспрессии гена циклофилина А (*PPIA*). Для полуколичественного ПЦР-анализа использовали набор реактивов для ПЦР («Силекс», Россия) и амплификатор T3 Thermocycler (Biometra, Германия), ПЦР-продукты анализировали с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле, для детекции результатов электрофореза использовали систему фотодокументации гелей Doc-It LS Imaging System (UVP, Германия). Для количественного ПЦР-анализа использовали набор реагентов для ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I («Синтол», Россия) и амплификатор Bio-Rad IQ5 (Bio-Rad Laboratories, США). Расчет уровней экспрессии производили с помощью метода градуировочного графика.

Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

Ген	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера	Температура отжига, °C
<i>PPIA</i>	ACGGGTCCTGGC ATCTTGTC	TGCTGGTCTTGCCAT TCCTG	65
<i>HNF4ATOT</i>	ACACGTCCCCATC TGAAG	CTTCCTTCTTCATGC CAG	65
<i>HNF4AP1</i>	ATGTGCAGGTGTT GACGATG	CTCGAGGCACCGTAG TGTTT	62
<i>HNF4AP2</i>	GGCCATGGTCAG AGTGAA	CTCGAGGCACCGTAG TGTTT	62
<i>PDX1</i>	AAAGCTCACGCG TGGAAGG	CGGCGGTTTTGGAAC CAGAT	65
<i>PTF1A</i>	CTCGTGCCTGGCC TACCC	GGCGTCGTTGATGGA CTGC	65
<i>HNF1A</i>	TCTAAGCTGAGCC AGCTGCAGACG	GCTGAGGTTCTCCGG CTCTTTCAG	65
<i>HNF1B</i>	GAAAGCAACGGG AGATCCTCCGAC	CCTCCACTAAGGCCT CCCTCTCTTCC	65
<i>FOXA1</i>	GGCCTACTCCTCT GTCCCTGTCAG	GCCGCAGTCATGCTG TTCAT	65
<i>FOXA2</i>	AGCCCCAACAAG ATGCTGACG	GGGTGCAGGGTCCA GAAGGAG	67
<i>ONECUT1</i>	CAGGGGACCCTC TCGGACCT	GGGCTTTTTGGGTGT GTTGCCTC	65

<i>ONECUT2</i>	ATGCCGGTCTCAG GGGACTCTC	TGCATGCTGCCAGGC GTAAG	68
<i>HNF4G</i>	CCGCAACAGCTG TGAAGTTG	TCCTCCAAACCGATC TGCAC	65
<i>AMY2A</i>	TGGGGAGAAGGT TGGGGTTT	CAGACCCAGTCATTG CCACAA	65
<i>CELA2A</i>	TGGCTGGAGCCCT CAGTTGT	GACCCTCCGCAGGTG TGGTA	65
<i>CDH1</i>	CGGAGGAGAGCG GTGGTC	GGCAGGGCGGGGAA GATA	65
<i>CDH2</i>	ACCCAGGAAAGG TGGCAGGT	GCGGGATGACCCAG TCTCT	65
<i>CDKN1A</i>	GCTGTCCCTCCCC CTTGTCT	TGTTCCGCTGCTAAT CAAAAG	60

Иммуноблоттинг

Лизаты клеточных культур получали с помощью буфера RIPA (Roche, Швейцария). Белки разделяли электрофорезом в 10%-ном полиакриламидном геле и переносили на PVDF-мембрану. Неспецифические сайты связывания блокировали в течение 1 часа 5%-ным раствором обезжиренного сухого молока на PBST. Далее мембрану инкубировали с антителами мыши к глицеральдегидфосфатдегидрогеназе (GAPDH) (ZG003, Invitrogen, США, разведение 1:2000), HNF4 α TOT (H1415, R&D Systems, США, разведение 1:4000), HNF4 α P1 (K9218, R&D Systems, США, разведение 1:2000) или HNF4 α P2 (H6939, R&D Systems, США, разведение 1:700) в течение 1 ч и со вторыми антителами козы к гамма-глобулину мыши (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., США, разведение 1:3000), конъюгированными с пероксидазой хрена, в течение 1 часа. Для оценки связывания антител с белком использовали систему детекции «ECL+ Plus Western blotting detection system» (Amersham Pharmacia Biotech, США). Интенсивность сигнала детектировали на приборе Chemycapt 3000 (Vilber-Lourmat, Германия) при помощи программы Chemycapt 3000. Интенсивность свечения полос оценивали с помощью программы Total Lab 2.01 (TotalLab Ltd., Великобритания).

Иммунофлуоресцентная окраска клеток

Клетки фиксировали в метаноле при -20 °C в течение 20 минут, инкубировали в растворе антител к HNF4 α TOT (H1415, R&D Systems, США, разведение 1:200) на PBS 30 мин, в растворе вторых антител козы к гамма-глобулину мыши, конъюгированных с флуоресцентной меткой AlexaFluor 488 (Invitrogen, США, разведение 1:200) на PBS с добавлением 3мкМ DAPI (Sigma, США) 30 мин, после чего заключали под покровное стекло с помощью эльванола. Для детектирования окрашенных клеток использовали флуоресцентный микроскоп Axioplan 2 и программу Axio vision 4.0 (Carl Zeiss, США).

Определение кинетики роста клеточных культур

В лунки 96-луночного планшета вносили по 1000 клеток и культивировали в течение 4, 24, 48, 72 и 96 ч. Подсчет клеток осуществляли на приборе SpectraMax M5^e (Molecular Devices, США) с использованием коммерческого набора CyQUANT NF Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. Изменение количества клеток рассчитывали как отношение сигнала после инкубации к сигналу, детектированному через 4 часа после посева клеток.

Оценка интенсивности синтеза ДНК

Для оценки ДНК-синтетической активности клеток использовали тест на включение 5-бромодезоксиуридина (5-BrdU) в ДНК клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла. Клетки в логарифмической фазе роста инкубировали в среде, содержащей 10 мМ 5-BrdU 2 часа. Затем клетки фиксировали метанолом и инкубировали в 1%-ном растворе Triton X-100 на PBS 3 минуты и в 4 н. растворе HCl 10 минут. Блокировку неспецифического связывания антител проводили 3%-ным раствором BSA на PBS, затем окрашивали клетки антителами к 5-BrdU (Zymo Research, США, разведение 1:100), как описано выше. Долю меченых 5-BrdU клеток подсчитывали в нескольких полях зрения, суммарное количество посчитанных клеток в препарате составляло не менее 1000.

Клоногенный тест

В чашки Петри диаметром 3 см вносили 1000 тщательно суспендированных клеток и культивировали 21 сутки. Образовавшиеся колонии фиксировали метанолом, окрашивали кристаллическим фиолетовым 5-10 минут и фотографировали. Для подсчета колоний использовали пакет программ Total Lab 2.01 (TotalLab Ltd., Великобритания).

Тест на направленную миграцию

В верхнее отделение модифицированной камеры-вставки Бойдена для 24-луночных планшетов «BD Falcon Cell Culture Insert» (BD Biosciences, США) с размером пор 8,0 мкм вносили по 10 000 клеток в 200-300 мкл бессывороточной среды RPMI-1640. В качестве хемоаттрактанта использовали 700 мкл среды RPMI-1640 с 5%-ной сывороткой в нижнем отделении камеры. Через 16 ч. клетки с верхней стороны мембраны удаляли, а клетки на нижней стороне окрашивали 2%-ным раствором кристаллического фиолетового в воде и подсчитывали при помощи микроскопа.

Статистическая обработка данных

Все данные были получены не менее чем в трех независимых экспериментах. Для обработки данных использовали программные пакеты Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, США), Origin Pro 9.0 (OriginLab Corporation, США) и GraphPad Prism 6

(GraphPad Software, USA). Для определения погрешностей вычислений находили стандартное отклонение от среднего значения обрабатываемой величины. Для выявления ошибки определения величин находили стандартное отклонение от среднего значения обрабатываемой величины. Достоверность отличий проверяли с помощью U-теста Манна-Уитни. Достоверными считали изменения, для которых показатель $p < 0,05$.

Результаты

В настоящей работе в качестве модельной системы была использована культура умереннодифференцированных клеток ПАКПЖ AsPC1 [4]. ОТ-ПЦР-анализ показал, что в клетках AsPC1 снижаются уровни экспрессии некоторых регуляторов дифференцировки ПЖ (*PDX1*, *PTF1A*, *HNFI1A*, *FOXA2*) по сравнению с нормальной тканью ПЖ. В то же время экспрессия генов, кодирующих ТФ HNF1B и ONECUT1 и секретируемые ферменты α -амилазу (*AMY2A*) и эластазу-2А (*CELA2A*), которые характерны для высокодифференцированных протоковых клеток, в клетках AsPC1 полностью подавлена, что говорит о начавшемся процессе дедифференцировки. В соответствии с ранее опубликованными данными [4], в клетках AsPC1 детектируется экспрессия не только группы изоформ HNF4 α P2, но и нехарактерных для нормальной ПЖ изоформ HNF4 α P1 (рис. 1А).

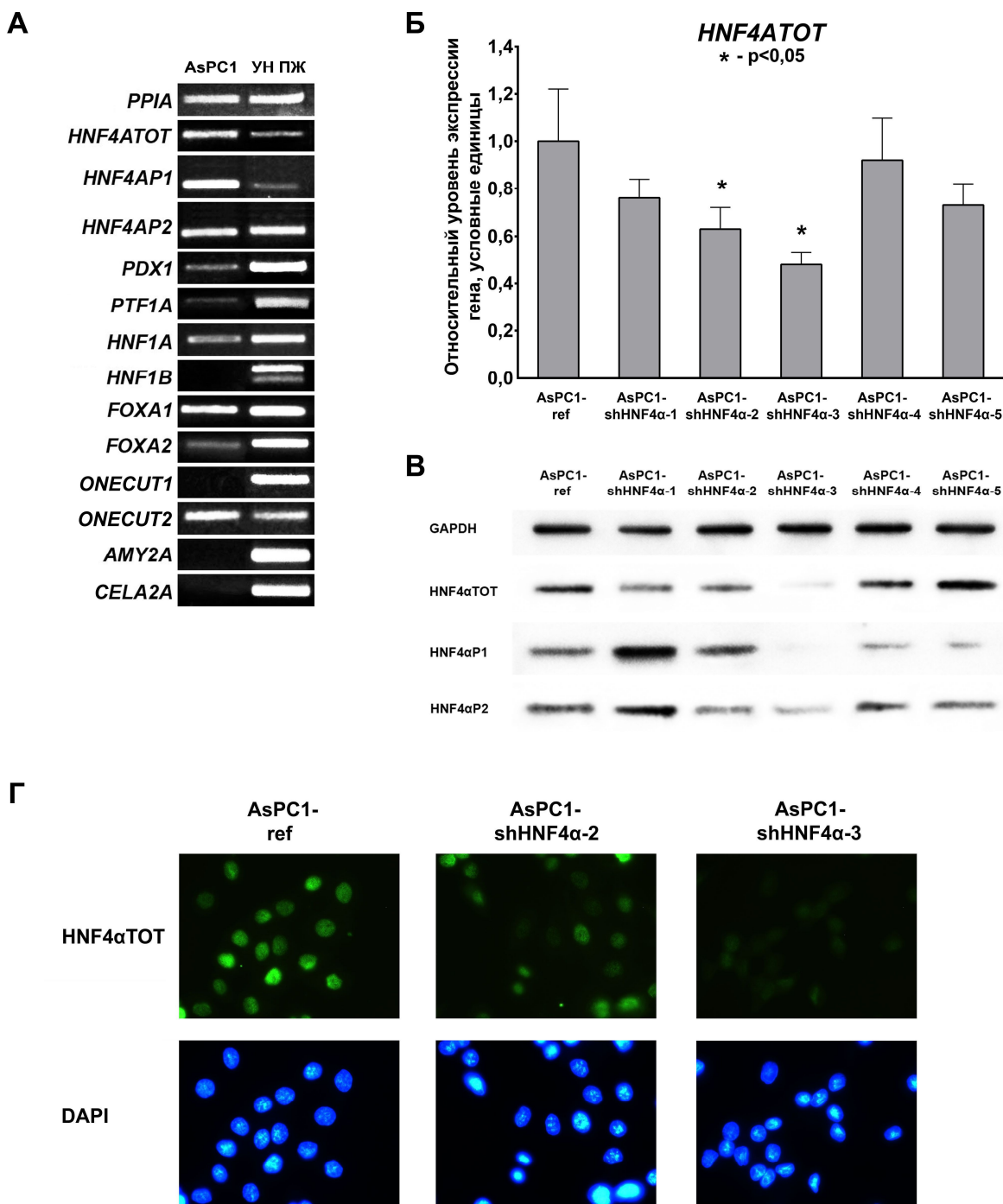


Рис. 1. Подавление синтеза фактора *HNF4α* в клетках линии *AsPC1* с помощью мшРНК

А. Спектр экспрессии панкреаспецифических генов в клетках *AsPC1* и условно нормальной ткани ПЖ (УН ПЖ), полуколичественный ОТ-ПЦР-анализ. Б. Уровни экспрессии *HNF4α* в культурах *AsPC1-shHNF4α*, количественный ОТ-ПЦР-анализ. В. Уровни синтеза белка *HNF4α* и групп его изоформ в культурах *AsPC1-shHNF4α*, иммуноблоттинг. Г. Интенсивность синтеза и локализация белка *HNF4α* в культурах *AsPC1-shHNF4α*, экспрессирующих мшРНК к *HNF4α*, иммунофлуоресцентное окрашивание, увеличение 40х

Для исследования эффектов, вызываемых подавлением экспрессии *HNF4α*, методом лентивирусной трансдукции были получены 5 культур клеток *AsPC1*, стабильно экспрессирующих различные варианты мшРНК, комплементарные последовательности мРНК *HNF4α* (далее *AsPC1-shHNF4α*). В качестве референсной культуры были

использованы клетки AsPC1, трансдуцированные вектором pLKO-1, несущим только ген устойчивости к пурамицину (далее AsPC1-ref). Эффективность подавления экспрессии HNF4 α оценивали методом количественного ОТ-ПЦР-анализа с праймерами, амплифицирующими все изоформы HNF4 α (*HNF4 α TOT*, рис. 1Б) и методом иммуноблоттинга с антителами, специфичными как ко всем изоформам (HNF4 α TOT), так и к отдельным группам изоформ (HNF4 α P1 и HNF4 α P2, рис. 1В). Для дальнейших экспериментов были использованы контрольная культура AsPC1-ref и культуры AsPC1-shHNF4 α -2 и AsPC1-shHNF4 α -3, в которых эффективность подавления HNF4 α была максимальной. При этом в культуре AsPC1-shHNF4 α -2 подавление HNF4 α произошло преимущественно за счет снижения уровня изоформ группы HNF4 α P2, а в культуре AsPC1-shHNF4 α -3 подавлен синтез обеих групп изоформ HNF4 α (рис. 1В). Подавление синтеза HNF4 α в выбранных культурах было дополнительно подтверждено методом иммунофлюоресцентного окрашивания клеток антителами HNF4 α TOT (рис. 1Г).

Чтобы исследовать влияние подавления экспрессии HNF4 α на биологические характеристики клеток AsPC1, определяющие их злокачественный потенциал, в экспериментах *in vitro* были проанализированы скорость роста, ДНК-синтетическая активность, колониеобразующая и миграционная способности выбранных клеточных культур (рис. 2). Основываясь на ранее полученных нами и описанных в литературе данных [3; 4; 6; 9; 10], мы ожидали, что подавление синтеза HNF4 α в клетках AsPC1 приведет к приобретению ими более выраженного злокачественного фенотипа. В соответствии с этим предположением клетки AsPC1-shHNF4 α демонстрировали существенно большую способностью к направленной миграции, чем контрольная культура AsPC1-ref (рис. 2А). Однако одновременно с повышением миграционного потенциала подавление синтеза HNF4 α вызвало значительное снижение скорости роста культур AsPC1-shHNF4 α по сравнению с контрольной культурой (рис. 2Б). Доля клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла и активно синтезирующих ДНК, в клетках AsPC1-shHNF4 α -2 и AsPC1-shHNF4 α -3 снизилась почти вдвое по сравнению с референсной культурой (рис. 2В). Этот результат позволяет предположить, что замедление роста культур AsPC1-shHNF4 α вызвано ослаблением пролиферативной активности, связанной с арестом клеточного цикла в фазе G1. Снижение пролиферативной активности клеток AsPC1 при подавлении HNF4 α сопровождалось также достоверным ослаблением их способности к формированию колоний в условиях высокого разведения (рис. 2Г). Таким образом, наблюдаемый комплекс эффектов, вызванных подавлением HNF4 α , не может быть истолкован как однозначное повышение или понижение злокачественного потенциала клеток, поскольку включает в себя выраженные изменения клеточных свойств, характерные для обоих процессов.

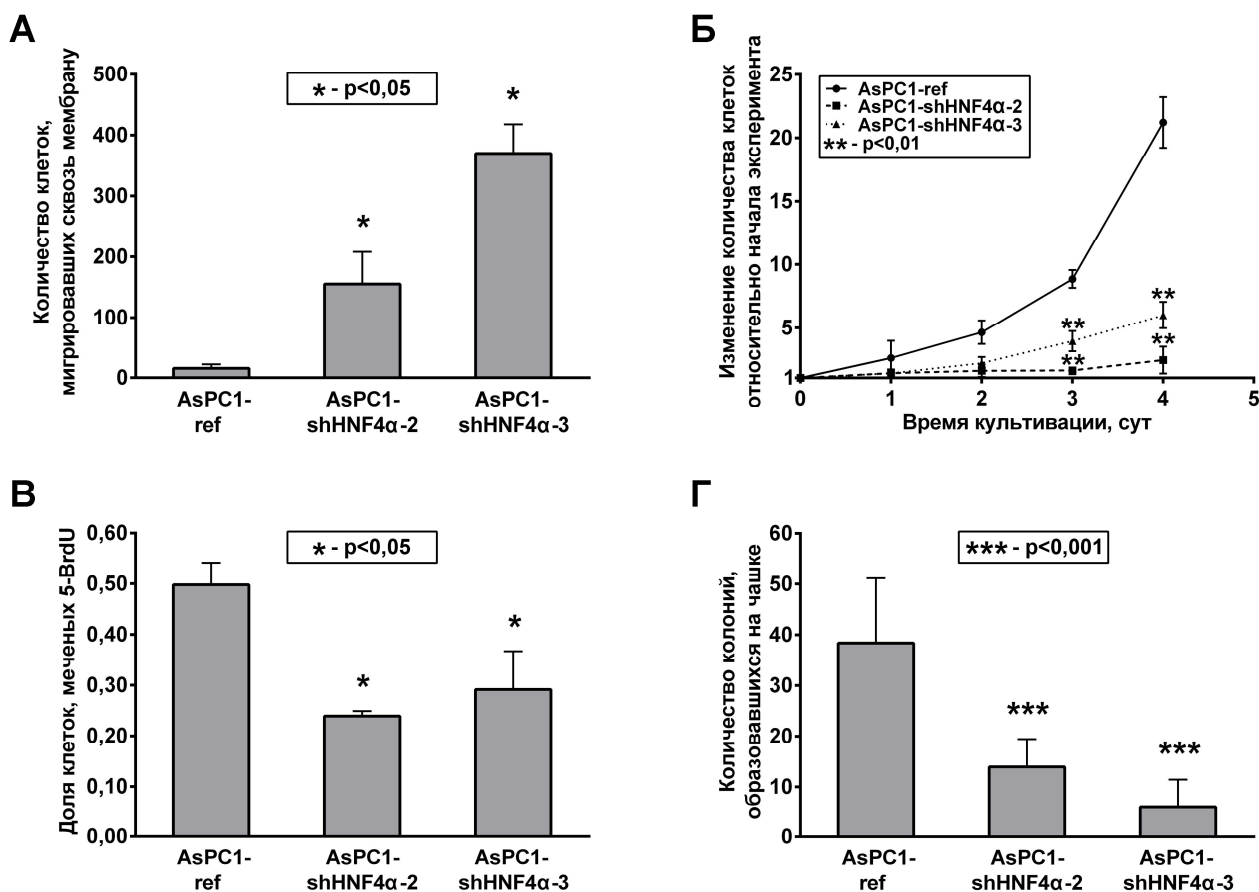


Рис. 2. Изменение биологических характеристик клеток *AsPC1* при подавлении синтеза *HNF4α*

А. Количество клеток, мигрировавших сквозь мембрану камеры Бойдена по градиенту хемоаттрактанта. Б. Кинетические кривые роста клеточных культур в условиях *in vitro*. В. Доля активно синтезирующих ДНК и включающих 5-BrdU-метку клеток. Г. Количество колоний, образованных клетками в условиях высокого разведения (1000 клеток на чашку Петри диаметром 3 см)

Для того чтобы понять, какие изменения экспрессии генов могут быть связаны с наблюдаемыми изменениями клеточных свойств, в исследуемых культурах методом полуколичественной ОТ-ПЦР были проанализированы уровни экспрессии основных регуляторов дифференцировки ПЖ, генов, активность которых характерна для нормального панкреатического эпителия, и гена *CDKN1A*, который кодирует регулятор клеточного цикла $p21^{CIP1/WAF1}$ и является прямой транскрипционной мишенью *HNF4α* [7]. Подавление синтеза *HNF4α* в клетках *AsPC1* не оказало однонаправленного воздействия на спектр экспрессии панкреаспецифических ТФ, контролирующих дифференцировку клеток. Так, экспрессия генов *PDX1*, *PTF1A* и *FOXA1* в клетках *AsPC1-shHNF4α* не изменилась, экспрессия генов *HNF1A* и *HNF4G* – снизилась, а гена *ONECUT2* – повысилась по сравнению с контрольной культурой. Влияние подавления *HNF4α* на активность гена *FOXA2* в исследованных

культурах отличалось – в клетках AsPC1-shHNF4α-2 его экспрессия снизилась, а в клетках AsPC1-shHNF4α-3 – усилилась. Активации генов *HNF1B* и *ONECUT1*, экспрессия которых характерна для дифференцированных протоковых клеток ПЖ и полностью подавлена в клетках AsPC1, в культурах AsPC1-shHNF4α не наблюдалось (рис. 3А). Подавление синтеза HNF4α индуцировало экспрессию панкреатической α-амилазы (*AMY2A*), но не эластазы-2А (*CELA2A*), в то время как в нормальной панкреатической ткани экспрессируются оба этих фермента (рис. 1А, 3Б). В клетках AsPC1-shHNF4α выявлено снижение экспрессии основного белка адгезионных контактов Е-кадгерина (*CDH1*) и одновременная активация экспрессии N-кадгерина (*CDH2*). Помимо этого, подавление синтеза HNF4α сопровождалось повышением уровня экспрессии гена *CDKN1A* (рис. 3Б). Таким образом, подавление HNF4α в клетках AsPC1 не вызвало значительных изменений их дифференцировочного статуса, но индуцировало «переключение» экспрессии с Е-кадгерина на N-кадгерин, что может быть связано с изменениями клеточной подвижности, и стимулировало экспрессию белка p21^{CIP1/WAF1}, являющегося важным регулятором клеточного цикла.

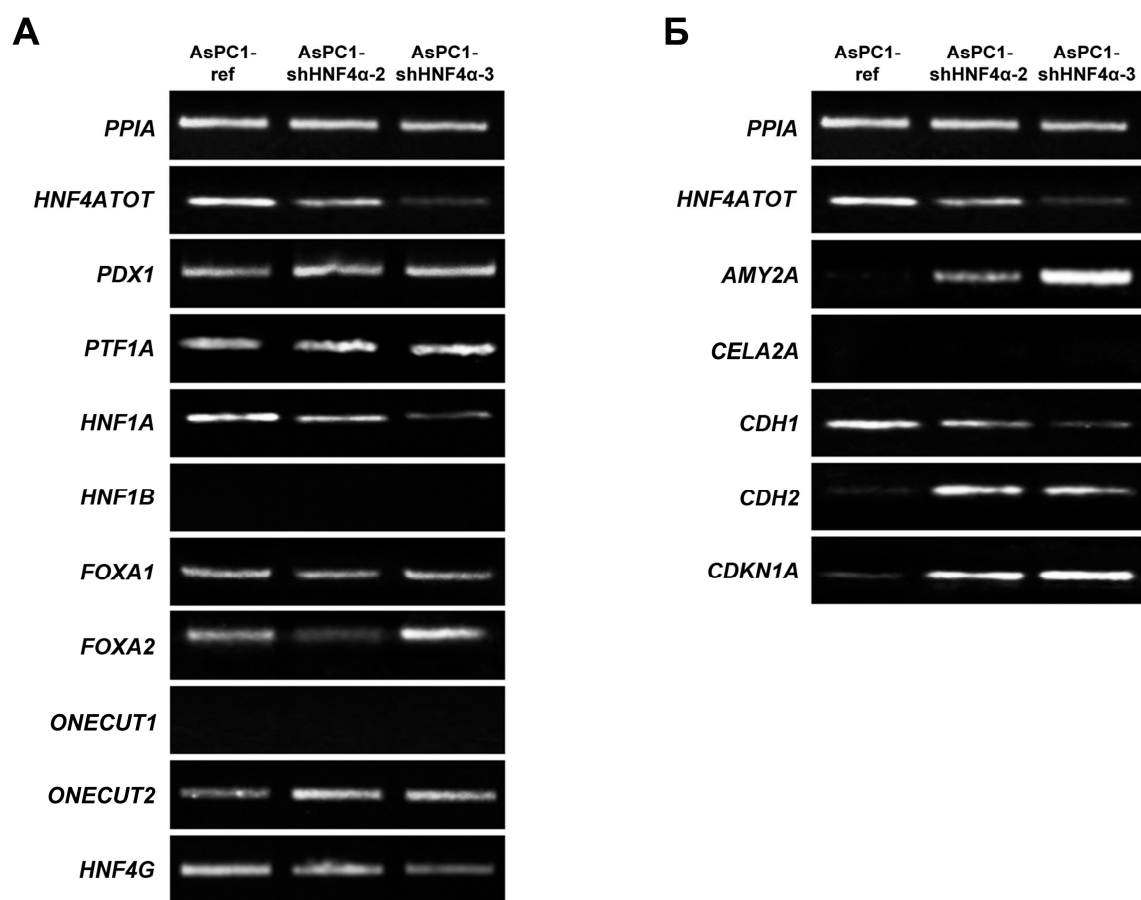


Рис. 3. Влияние подавления синтеза HNF4α на экспрессию генов в клетках AsPC1

А. Уровни экспрессии основных генов-регуляторов дифференцировки ПЖ, полуколичественный ОТ-ПЦР-анализ. Б. Уровни экспрессии функциональных генов ПЖ,

связанных с дифференцировкой и контролем биологических характеристик, полуколичественный ОТ-ПЦР-анализ

Обсуждение

Инактивация опухолевых супрессоров – одно из ключевых событий в прогрессии опухолей. Функциями опухолевых супрессоров могут обладать как белки, напрямую контролирующие биологические свойства клеток (пролиферацию, миграцию, апоптоз), так и факторы, регулирующие клеточную дифференцировку, в частности тканеспецифические ТФ. Так как один «ключевой» ТФ может одновременно регулировать экспрессию большого количества генов-мишеней, связанных с различными системами клетки, нарушения функций ключевых ТФ при канцерогенезе часто приводят к более комплексным изменениям, чем нарушения функций отдельных эффекторов [1]. В клетках ПЖ такими критичными факторами являются белки PDX1, PTF1 α и факторы семейства HNF, в частности – HNF4 α [1; 14].

Ранее нами было показано, что HNF4 α также может обладать функциями опухолевого супрессора в клетках ПАКПЖ, при этом опухолесупрессорное действие было описано не только для панкреаспецифических изоформ группы HNF4 α P2, но и для нехарактерной для ПЖ изоформы HNF4 α 1 [3; 4]. Однако на фоне этих результатов оставалась неисследованной возможная роль гиперэкспрессии изоформ HNF4 α P1, которая наблюдается в культуре AsPC1 (рис. 1А) [4]. Повышение общего уровня синтеза HNF4 α выявлено также Kim и соавторами в пренеопластических образованиях ПЖ и на самых ранних стадиях развития ПАКПЖ, однако в этой работе изменения экспрессии отдельных изоформ HNF4 α не изучались [8]. Мы предположили, что гиперэкспрессия HNF4 α , и в частности активация изоформ группы HNF4 α P1, может играть важную роль на ранних стадиях прогрессии ПАКПЖ, и поэтому исследовали эффекты, вызываемые подавлением синтеза HNF4 α в клетках AsPC1.

Значительное повышение способности клеток AsPC1 к направленной миграции при подавлении HNF4 α согласуется с гипотезой об опухолесупрессорной функции HNF4 α и с результатами, полученными ранее при исследовании высокодифференцированной культуры клеток ПАКПЖ Saran2 [3]. Однако резкое снижение пролиферативной и колониеобразующей способности клеток AsPC1-shHNF4 α свидетельствует о том, что сохранение экспрессии HNF4 α может быть необходимо для поддержания клеток ПАКПЖ в состоянии активной пролиферации. Таким образом, HNF4 α может обладать не описанными ранее проопухолевыми функциями.

Следует отметить, что хотя в культуре AsPC1-shHNF4 α -2 действие мшРНК затронуло только изоформы группы HNF4 α P2, а в культуре AsPC1-shHNF4 α -3 был подавлен синтез обеих групп изоформ, мы не выявили принципиальных отличий в биологических свойствах

между культурами AsPC1-shHNF4 α -2 и AsPC1-shHNF4 α -3 (рис. 1Б). Группы изоформ HNF4 α P1 и HNF4 α P2 обладают разным транскрипционным потенциалом и могут по-разному влиять на экспрессию одних и тех же генов в зависимости от набора кофакторов, с которыми они взаимодействуют [13]. По всей видимости, изоформы группы HNF4 α P2 являются более значимыми регуляторами биологических свойств клеток ПАКПЖ, чем HNF4 α P1; однако подавление синтеза HNF4 α P2 в клетках Capan2 сопровождается повышением, а не понижением пролиферативной активности [3]. Возможно, изоформы группы HNF4 α P1, активно экспрессирующиеся в клетках AsPC1, способны связываться с изоформами HNF4 α P2, формировать димерный комплекс и таким образом модулировать активность HNF4 α P2, придавая последнему проопухолевые функции, однако эта гипотеза на сегодняшний день не исследована.

Описанный комплекс изменений (повышение миграционного потенциала и снижение пролиферативной активности) ведет к приобретению клетками так называемого миграторного фенотипа, который характерен для высокометастатических субпопуляций опухолевых клеток. В клетках с таким фенотипом наблюдаются изменения, характерные для процессов дедифференцировки и эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). В то время как подавление экспрессии HNF4 α не оказало однонаправленного влияния на экспрессию основных регуляторов дифференцировки ПЖ (рис. 3А), активация экспрессии панкреатической α -амилазы в клетках AsPC1-shHNF4 α указывает на их частичную редифференцировку. С одной стороны, реактивация гена *AMY2A* может говорить о том, что в клетках AsPC1-shHNF4 α действуют регуляторные пути, характерные для ацинарных клеток. С другой стороны, сам факт того, что подавление синтеза HNF4 α может стимулировать редифференцировку клеток, еще раз подтверждает наличие у HNF4 α неохарактеризованных функций, так как ранее в литературе было описано только продифференцировочное действие HNF4 α [1; 6; 9].

Наблюдаемые в клетках AsPC1-shHNF4 α изменения экспрессии Е- и N-кадгеринов характерны для клеток, претерпевающих ЭМП. Замена стабильных Е-кадгериновых адгезионных контактов на более лабильные N-кадгериновые является одним из механизмов, обеспечивающих повышение клеточной подвижности. Однако клетки исходной культуры AsPC1 характеризуются очень слабой способностью к формированию межклеточных контактов, поэтому маловероятно, что изменение экспрессии кадгеринов в клетках AsPC1-shHNF4 α может быть основной причиной повышения их миграционного потенциала.

Важным регулятором клеточных свойств, экспрессия которого повышается в клетках AsPC1 при подавлении синтеза HNF4 α , является белок p21^{CIP1/WAF1}, кодируемый геном *CDKN1A*. Этот белок обладает как анти-, так и проопухолевыми функциями: локализуясь в

ядре, он ингибирует клеточную пролиферацию и стимулирует репарацию ДНК, в то время как в цитоплазме он подавляет апоптоз и стимулирует перестройку актина, повышая подвижность клеток [11]. В свете этих фактов повышение экспрессии *CDKN1A* в клетках AsPC1-shHNF4α хорошо согласуется с наблюдаемым ослаблением их пролиферативной активности и повышением миграционного потенциала. Более того, ген *CDKN1A* является прямой транскрипционной мишенью HNF4α, вследствие чего регуляция экспрессии p21^{CIP1/WAF1} рассматривается как наиболее вероятный механизм влияния HNF4α на пролиферативную активность клеток [7]. Однако изоформы HNF4αP1 описаны как активаторы, а не ингибиторы активности гена *CDKN1A*, что противоречит наблюдаемой нами активации *CDKN1A* при подавлении HNF4α (рис. 3Б). По всей видимости, механизм HNF4α-зависимой регуляции экспрессии p21^{CIP1/WAF1} необходимо исследовать детальнее, чтобы учесть возможные различия в действии изоформ HNF4αP1 и HNF4αP2 на активность гена *CDKN1A*.

Заключение

В данной работе впервые продемонстрировано, что фактор HNF4α в клетках ПАКПЖ может не только выполнять роль опухолевого супрессора, но и проявлять проопухолевые функции. Подавление его синтеза в умереннодифференцированных клетках ПАКПЖ вызывает изменения их свойств, ассоциированные как с усилением, так и с ослаблением злокачественного потенциала. Вероятным механизмом проопухолевого действия HNF4α на клетки ПАКПЖ является его гиперэкспрессия, связанная с активацией синтеза нехарактерной для нормальной ткани ПЖ группы изоформ HNF4αP1. Мы предполагаем, что спектр экспрессии изоформ HNF4α является ключевым параметром, определяющим общее влияние изменения экспрессии HNF4α на биологические свойства клеток ПАКПЖ.

Список литературы

1. Лазаревич Н.Л. Тканеспецифические транскрипционные факторы в прогрессии эпителиальных опухолей / Д.И. Флейшман // Биохимия. – 2008. – Т. 73, № 5. – С. 713-734.
2. Чесноков М.С. Молекулярные биомаркеры протоковой аденокарциномы поджелудочной железы и возможности их использования в клинической практике / Д.А. Шавочкина, А.Д. Горев, Н.Л. Лазаревич // Молекулярная медицина. – 2013. – № 6. – С. 21-26.
3. Чесноков М.С. Повышение злокачественного потенциала клеток протоковой аденокарциномы поджелудочной железы человека при подавлении синтеза ядерного рецептора HNF4α // Молекулярная медицина. – 2014. – № 4. – С. 22-26.

4. Чесноков М.С. Частичная редифференцировка и понижение выраженности черт злокачественного фенотипа клеток протоковой аденокарциномы поджелудочной железы человека при экспрессии ядерного рецептора HNF4 α / И.Ф. Кустова, Д.А. Шавочкина, А.Г. Кузнецова, Н.Л. Лазаревич // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 3. – С. 17-23.
5. Bonner-Weir S. Transdifferentiation of pancreatic ductal cells to endocrine beta-cells. / A. Inada, S. Yatoh // Biochem. Soc. Trans. – 2008. – Vol. 36, № 3. – P. 353-356.
6. Cattin A.L. Hepatocyte nuclear factor 4 α , a key factor for homeostasis, cell architecture, and barrier function of the adult intestinal epithelium / J. Le Beyec, F. Barreau et al. // Mol. Cell. Biol. – 2009. – Vol. 29, № 23. – P. 6294-6308.
7. Hwang-Verslues W.W. Nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4 α 1 competes with oncoprotein c-Myc for control of the p21/WAF1 promoter / F.M. Sladek // Mol Endocrinol. – 2008. – Vol. 22, № 1. – P. 78-90.
8. Kim J. An iPSC line from human pancreatic ductal adenocarcinoma undergoes early to invasive stages of pancreatic cancer progression / J.P. Hoffman, R.K. Alpaugh et al. // Cell Rep. – 2013. – Vol. 3, № 6. – P. 2088-2099.
9. Lazarevich N.L. Progression of HCC in mice is associated with a downregulation in the expression of hepatocyte nuclear factors / O.A. Cheremnova, E.V. Varga et al. // Hepatology. – 2004. – Vol. 39, № 4. – P. 1038-1047.
10. Lucas B. HNF4 α reduces proliferation of kidney cells and affects genes deregulated in renal cell carcinoma / K. Grigo, S. Erdmann et al. // Oncogene. – 2005. – № 24 (42). – C. 6418-6431.
11. Romanov V.S. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Waf1): contemporary view on its role in senescence and oncogenesis / V.A. Pospelov, T.V. Pospelova // Biochemistry (Mosc). – 2012. – Vol. 77, № 6. – P. 575-584.
12. Tanaka T. Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 α in the pathogenesis of human cancer / S. Jiang, H. Hotta et al. // J. Pathol. – 2006. – Vol. 208, № 5. – P. 662-672.
13. Torres-Padilla M.E. Developmentally Regulated N-Terminal Variants of the Nuclear Receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4 α Mediate Multiple Interactions through Coactivator and Corepressor-Histone Deacetylase Complexes / F.M. Sladek, M.C. Weiss // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277, № 47. – P. 44677–44687.
14. Zaret K.S. Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas / M. Grompe // Science. – 2008. – Vol. 322, № 5907. – P. 1490-1494.