

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ У НОРМАЛЬНІЙ КЛІТИННІЙ ЛІНІЇ ТА У КЛІТИННИХ ЛІНІЯХ РАКУ ПРОСТАТИ ЛЮДИНИ

Є. Е. РОЗЕНБЕРГ, Г. В. ГЕРАЩЕНКО, В. І. КАШУБА

Державна ключова лабораторія молекулярної і клітинної біології,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: y.e.rozenberg@imbg.org.ua

Рак простати є однією з головних причин смертності у чоловіків із злоякісними захворюваннями. Тому пошук біомаркерів раку простати, які б дозволяли відрізняти агресивні метастазуючі пухлини від латентних є актуальною проблемою. Метою роботи було дослідження рівня експресії генів на модельних лініях нормальних епітеліальних клітин PNT2 та ліній клітин, одержаних із пухлин простати людини, різних за ступенем агресивності та метастазування, – LNCaP, DU145 та PC3 – для пошуку диференційно експресованих генів, які дозволять створити панель маркерів прогнозу перебігу захворювання на рак. У цій роботі методом кількісної ПЛР (к-ПЛР) визначено відносну експресію 65 генів, пов'язаних з канцерогенезом. Зміни експресії знайдено для 29 генів у клітинній лінії LNCaP, для 20 – в лінії DU145 та 16 – в лінії PC3 порівняно з нормальною клітинною лінією простати PNT2. Аналіз експресії генів дозволяє говорити про епітеліально-мезенхімальний перехід, який включає в себе втрату епітеліальних маркерів, зниження клітинної адгезії, посилення міграції. Серед цих генів знайдено диференційно-експресовані гени в клітинних лініях раку простати. Виявлено, що найбільших змін зазнає експресія генів, які контролюють адгезію клітин (CDH1), інвазивність та метастазування (IL8, CXCL2), а також контроль клітинного циклу (P16, CCNE1). Ці гени можуть бути використані з метою створення панелей для діагностики та/або прогнозу інвазивних метастазуючих пухлин простати.

Ключові слова: рак простати людини, андрогеннезалежний, андрогензалежний рак простати, метастазування, біомаркери, клітинні лінії, експресія генів, сигнальні шляхи.

Рак передміхурової залози в чоловіків на сьогодні є досить розповсюдженим захворюванням. У світі на нього страждають близько 899 тис. чоловіків [1]. В Україні за даними 2011 року захворюваність та смертність від раку простати стоїть на третьому місці [2]. Останнім часом багато уваги приділяється пошуку біомаркерів, які б дали змогу диференціювати ступінь агресивності пухлин простати. Клітинні лінії, одержані з первинних пухлин раку простати з різним ступенем агресивності, можуть бути придатною моделлю для вивчення особливостей експресії генів та пошуку механізмів переходу від андрогенчутливого раку простати до андрогеннечутливого та метастазування.

Клітинна лінія PNT2 – це клітини нормального епітелію простати дорослої людини, які містять геном SV40 та експресують великий Т-антиген. Ця клітинна лінія є моделлю

диференційованих нормальних епітеліальних клітин простати людини.

LNCaP – класична клітинна лінія аденокарциноми простати людини, одержана з надключичного лімфатичного вузла з метастазами. У клітинах культури присутні високоафінні специфічні рецептори андрогенів у цитоплазмі і ядрі. Рецептори естрогенів присутні в цитоплазмі, тому ця клітинна лінія є гормонально чутливою [3]. Зазвичай її використовують для дослідження чутливої до андрогенів аденокарциноми простати.

Клітинні лінії DU145 та PC3 одержані з агресивного раку простати [4]. Пухлини з клітинної лінії DU145 (до речі, одержані з клітин метастазів у мозок) виявляють в мишей середній потенціал до метастазування [5]. Клітинна лінія DU145 є гормоннезалежною та не експресує простатоспецифічний анти-

ген (ПСА) [6]. Пухлини, одержані з клітинної лінії PC3 в експериментальних тварин, можуть показувати високий потенціал до метастазування. Лінію PC3 було одержано з розвиненої метастазуючої, андрогеннезалежної пухлини простати. Ця клітинна лінія має знижену 5- α -редуктазну активність, не експресує ПСА та простатоспецифічний мембранний антиген (ПСМА) [5]. Клітини цієї лінії експресують нейроендокринні маркери (хромогранін А, нейронспецифічну енолазу CD44) так само як і клітини дрібноклітинної (нейроендокринної) карциноми простати [3], що робить її моделлю, придатною для дослідження агресивного андрогеннезалежного раку простати.

Метою роботи було дослідження рівня експресії генів на модельних лініях нормальних епітеліальних клітин PNT2 та клітин LNCaP, DU145 та PC3, одержаних із пухлин простати людини, різних за ступенем агресивності та метастазування, для пошуку диференційно експресованих генів, які дозволять створити панель маркерів для оцінки ступенів агресивності та метастазування раку простати.

Матеріали і методи

Культури клітин. Клітинні лінії раку простати людини LNCaP, PC3, DU145 було отримано з Каролінського інституту (Стокгольм, Швеція), а клітинну лінію нормальних епітеліальних клітин PNT2 – з Європейської колекції клітинних культур (Солсбері, Велика Британія). Всі клітинні лінії культивували в модифікованому середовищі RPMI 1640 із додаванням 2 мМ L-глутаміну, 100 одиниць пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 10% (об./об.) ембріональної бичачої сироватки при температурі 37 °C та в атмосфері з 5% CO₂. Клітини збирали для аналізу з використанням трипсину/ЕДТА.

Виділення тотальної РНК. Тотальну РНК із клітин виділяли за допомогою набору RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Німеччина). Далі проводили обробку ДНКазою I (Thermo Scientific, США) згідно з інструкцією виробника. Якість одержаної РНК перевіряли електрофорезом.

Синтез кДНК. Використовуючи набір First Strand cDNA Synthesis kit та оліго(dT)-праймери (Thermo Scientific, США), кДНК синтезували із 3 мкг загальної РНК.

Кількісну полімеразну ланцюгову реакцію (к-ПЛР) в реальному часі проводили з використанням SYBR Green Master mix на ампліфікаторі 7500 (Applied Biosystems, США) за таких умов: 95 °C – 10 хв, наступні 40 циклів 95 °C – 15 с, 60 °C – 1 хв.

Панель відібраних генів для к-ПЛР. Було підібрано панель із 65 генів, які належать до різних сигнальних шляхів, із референсними генами *GAPDH* та *ACTB* [8]. Праймери до цих генів було відібрано з бази даних праймерів для кількісної ПЛР: <http://primerdepot.nci.nih.gov/>.

Одержані дані аналізували в програмі Excel-based PCR Array Data Analysis Software (SABioscience). Відносний рівень експресії генів у ракових клітинних лініях одержували методом 2- $\Delta\Delta C_P$ [9]. Контролем слугувала клітинна лінія нормального епітелію простати (PNT2).

Статистичну обробку проводили як було описано раніше [10, 11].

Результати та обговорення

Для аналізу експресії генів клітинних ліній простати було відібрано 65 генів, які беруть участь у канцерогенезі та метастазуванні в дев'яти сигнальних шляхах: 1) Wnt: канонічний (*FAT1*, *WNT7A*, *TCF7L2*, *KIAA1199*, *SUFU*), неканонічний (*RHOA*, *PLCB1*, *MYO1B*); 2) ядерного фактора κ – енхансеру легкого ланцюга активованих В-клітин (NF- κ B) (*IL8* – активація шляху; *CXCL2*, *TNFRSF11B*, *S100A4*, *IL1B*, *IL6*, *IL1RL1*); 3) p53 (*CCNB2*, *CCNE1*, *TAGLN*, *P16*, *SOX4*, *TSC2*); 4) системи міжклітинного матриксу та адгезії клітин, до якої входять адгезія клітин (*CDH1*, *CDH2*, *GLCE*, *PLOD2*), β -1-інтегрин-взаємодія поверхні клітин (*CSPG4*), сигналінг ефринів (*EFNA*, *FYN*, *MYO10*), фокальна адгезія (*THBS4*, *MXRA5*, *SPPI*, *ACTA2*, *ACTB*, *RHOF*), сигналінг відштовхування шляхом інгібування адгезії інтегрину (*SEMA3A*, *PLXNA*, *CDK5*, *ACTA2*, *FYN*); 5) сигнальної трансдукції (*RASSF4*, *AGTR1*, *KCNJ2*, *KCNJ4*, *IL33*, *CAV1*, *PKM2*, *NR5A2*) та транскрипційних факторів (*HOXA13*, *PAX8*, *SOX4*); 6) інвазивності та метастазування (*SERPINE1*, *SERPINE2b*, *PLAU*, *S100A4*, *SERPINE2a*); 7) ангиогенезу (*DCN*, *IL8*, *MME*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL6*, *CXCR2*, *PREX1*, *PLCB1*); 8) контролю клітинного циклу та репарації ДНК (*PCNA*, *Ki67*, *CCNB2*, *CCNE1*, *P16*, *RNASET2*), який включає також системи чутливості до

апоптозу (*TERT*), шлях EGFR (*HBEGF*, *P27*); 9) метаболізму триптофану (*TPH1*). Гени, що вивчалися, належать до таких груп: цитокини та хемокини (*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL6*), інтерлейкіни та рецептори до них (*IL6*, *IL8*, *IL1B*, *IL1RL1*), транскрипційні фактори (*HOXA13*, *PAX8*, *SOX4*), ядерні рецептори (*NR5A2*), а також гени, що кодують протеїни мембранних каналів (*KCNJ2*, *KCNJ4*), кінази (*FYN*, *CDK5*), серпінові інгібітори пептидаз (*SERPINE1*, *SERPINE2a*, *SERPINE2b*) та ін.

Дані відносної експресії генів у клітинних лініях простати представлено в табл. 1.

Із 65 генів, відібраних для дослідження, у 35 генів зміни експресії виявлено більше ніж у 4 рази. Для 26 – рівень експресії знижується, для 7 – підвищується, а для 2 – виявляється перемінний рівень експресії порівняно з експресією генів у лінії PNT2. П'ятнадцять генів, які мають дуже низький рівень відносної експресії, з пороговим циклом більше ніж 30 у лінії PNT2 в табл. 1 не внесено та не розглядаються в зв'язку з неможливістю отримання вірогідних результатів.

Так, у класичному шляху Wnt із восьми генів, які вивчалися, рівень відносної експресії знижується для чотирьох генів (*WNT7A* – в LNCaP, DU145; *TCF7L2*, *FAT1* – в LNCaP; *MYO1B* – в LNCaP, PC3) та не змінюється експресія одного гену (*SUFU*). Ген *WNT7A* кодує один із Wnt-протеїнів, які, зв'язуючись з рецепторами на поверхні клітин, стабілізують цитоплазматичний β -катенін, що може активувати транскрипційні фактори родини LEF/TCF, до яких входить *TCF7L2*. На пухлинах світлоклітинної карциноми нирок було показано, що рівень експресії гену *WNT7A* знижується [12]. Ген *TCF7L2* може репресувати транскрипцію генів, залежних від рецептора андрогенів (AR) у пухлинах молочної залози, що робить його цікавим об'єктом для досліджень і в андрогенчутливих пухлинах простати [13]. Ген *FAT1* кодує трансмембранний протокадгерин. Цей ген часто інактивується або делетується в деяких видах раку, що робить його потенційним геном-супресором росту пухлин. Було відмічено його здатність інгібувати сигнальний шлях Wnt/ β -катеніну за рахунок зв'язування з β -катеніном у гліобlastомах, пухлинах товстої та прямої кишки, а також пухлинах шиї і голови [14].

Окрім канонічного шляху Wnt, є шлях планарної клітинної полярності (Planar Cell Polarity). Він відповідає за правильну поляризацію клітин впродовж формування тканин. Ген *MYO1B* кодує міозин IB, який регулюється Rho-протеїнами та забезпечує клітинну міграцію. Спираючись на одержані дані, можна відмітити інгібування класичного Wnt-шляху в клітинній лінії, одержаної з неагресивної пухлини, що підтверджується даними літератури [15].

Серед досліджуваних генів шляху NF- κ B два гени (*TNFRSF11B* – в усіх лініях, *IL6* – в LNCaP) виявляють знижений рівень експресії, три гени (*IL8* – в DU145, PC3; *CXCL2* – в DU145; *S100A4* – в LNCaP, DU145) – підвищений рівень, а два гени експресуються по-різному: *IL1RL1* – в LNCaP та DU145 має знижений рівень експресії, а в PC3 – підвищений рівень експресії; *IL1B* – підвищений рівень експресії в LNCaP, PC3, а в DU145 – знижений рівень. Ген *TNFRSF11B* кодує протеїн остеопротегерин (член суперродини рецепторів фактора некрозу пухлин), який є інгібітором RANKL (ліганд активаторного рецептора для NF- κ B) та шляху NF- κ B, і сприяє зменшенню метастазів у кістки [16]. Ген *IL1RL1* кодує інтерлейкінподібний рецептор 1 і належить до родини Toll-подібних рецепторів. Останній може існувати в двох ізоформах: секретуватися або бути зв'язаним із мембраною. На клітинній лінії моноцитної лейкемії показано, що секретований IL1RL1 має здатність перешкоджати деградації I κ B-кіназного комплексу, що утримує NF- κ B в неактивному стані, причому зменшується рівень цитокинів запалення, зокрема інтерлейкіну 6 (*IL6*) [17]. Гени *IL8* та *IL1B* кодують інтерлейкін 8 та інтерлейкін 1- β , що, навпаки, активують NF- κ B. Інтерлейкін 8 – цитокін запалення, який є одним із важливих медіаторів переходу від андрогенчутливого до андрогеннечутливого раку простати. Його інгібування спричинює зупинку клітинного циклу та апоптоз в клітинних лініях DU145, PC3 [18]. Алейний поліморфізм гену *IL1B* асоціюють з рецидивом пухлин простати [19]. Ген *CXCL2* кодує хемокин, який є транскрипційною мішенню для шляху NF- κ B, і, в свою чергу, зумовлює зміни в регуляції генів. Інгібування експресії цього гену призводить до зниження проліферації та активації апоптозу [20]. Ген *S100A4* кодує

Таблиця 1. Сигнальні шляхи та зміна експресії генів у клітинних лініях раку простати

№	Шляхи	Гени	Клітинні лінії					
			LNCaP	DU145	PC3	LNCaP	DU145	PC3
			Підвищення експресії			Зниження експресії		
0	1	2	3	4	5	6	7	8
1	Wnt-шлях	<i>TCF7L2</i>	0	0	0	4,2	0	0
		<i>FAT1</i>	0	0	0	4,6	0	0
		<i>WNT7A*</i>	0	0	0	69,6*	44,6*	0
		<i>SUFU</i>	0	0	0	0	0	0
		<i>MYO1B</i>	0	0	0	51,4	0	15,5
2	NF-κB	<i>IL1B</i>	21,0	0	445,7	0	15,4*	0
		<i>IL8</i>	0	4,8	5,8	0	0	0
		<i>CXCL2</i>	0	4,5	0	0	0	0
		<i>SI00A4</i>	23,6	17,8	0	0	0	0
		<i>TNFRSF11B*</i>	0	0	0	11489,3*	35,9*	15,8
		<i>IL6</i>	0	0	0	0	0	44,8
		<i>IL1RL1*</i>	0	0	15,1	1016,2*	468,2*	0
		<i>IL33</i>	0	BE	0	0	BE	0
3	p53	<i>TAGLN</i>	0	0	0	4,5	0	10,0
		<i>CCNB2</i>	0	0	0	107,7	0	0
		<i>CCNE1</i>	0	0	0	4,1	0	11,5
		<i>PI6</i>	0	4,3	0	0	0	0
		<i>SOX4</i>	0	0	0	5,2	0	0
		<i>TSC2</i>	0	0	0	0	0	0
4	Міжклітинний матрикс та клітинна адгезія	<i>CDH1*</i>	0	0	0	1530,7*	0	3145,3*
		<i>CDH2</i>	0	BE	0	0	BE	0
		<i>GLCE</i>	0	0	0	0	0	0
		<i>CSPG4*</i>	0	0	0	4,9	71,0*	6864,8*
		<i>EFNA5</i>	0	0	0	32,2	0	6,0
		<i>FYN</i>	0	0	0	18,8	6,4	0
		<i>MYO10</i>	0	0	0	0	0	0
		<i>CDK5</i>	0	0	0	27,0	0	0
		<i>SEMA3A*</i>	0	0	0	0	75,5*	0
		<i>PKM2</i>	0	0	0	0	0	0
		<i>RHOF</i>	0	0	0	0	0	0
		<i>AGTR1</i>	BE	BE	BE	BE	BE	BE
		<i>MXRA5</i>	BE	BE	BE	BE	BE	BE
		<i>CAVI</i>	0	0	0	0	0	0
<i>ACTB</i>	0	0	0	0	0	0		
<i>PLOD2</i>	0	0	0	0	0	0		

Таблиця 1. Продовження

0	1	2	3	4	5	6	7	8
5	Сигнальна трансдукція та транскрипційні фактори	<i>RASSF4</i>	0	0	0	12,8	5,3	0
		<i>HOXA13</i>	0	0	7,4	0	0	0
		<i>NR5A2*</i>	0	0	0	13,6	0	28,6*
6	Інвазивність та метастазування	<i>SERPINE1*</i>	0	0	0	7,7	373,3*	0
		<i>PLAU</i>	0	0	0	15,2	7,7	0
		<i>SERPINE2b*</i>	0	0	BE	7,3	424,0*	BE
		<i>SI00A4</i>	23,6	17,8	0	0	0	0
		<i>SERPINE2a</i>	0	0	0	9,1	7,6	0
7	Ангіогенез	<i>IL8</i>	0	4,8	5,8	0	0	0
		<i>MME*</i>	0	0	0	6,1	4179,2*	18,0
		<i>CXCL1</i>	0	0	0	116,3	16,0	10,0
		<i>CXCL2</i>	0	4,5	0	0	0	0
		<i>CXCL6 *</i>	0	0	0	142,0*	4,1*	0
8	Контроль клітинного циклу та репарація ДНК	<i>PCNA</i>	0	0	0	4,7	0	0
		<i>Ki67</i>	0	0	0	0	0	0
		<i>HBEGF*</i>	0	0	0	413,9*	28,1*	15,5*
		<i>P27</i>	0	0	0	0	0	0
		<i>CCNB2</i>	0	0	0	107,7	0	0
		<i>CCNE1</i>	0	0	0	4,1	0	11,5
		<i>P16</i>	0	4,3	0	0	0	0
		<i>RNASET2</i>	0	0	0	0	0	0

Тут і в табл. 2: «0» – зміни експресії менше ніж у 4 рази; «*» – слабоекспресовані гени в дослідних клітинних лініях (LNCaP, DU145, PC3)(Ct>30); «BE» – відсутність експресії.

кальційзв'язуючий протеїн, який регулює клітинний цикл, диференціацію та є одним із протеїнів епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП). Він є позитивним регулятором шляху NF-κB [21]. Після аналізу одержаних даних рівня експресії генів цього шляху не можна однозначно виявити його активацію або інгібування. Активаторні механізми працюють паралельно з інгібіторними. Це пояснюється певною мірою складною організацією пухлин. Так, поряд із підвищенням активності цитокінів запалення відбуваються процеси некрозу пухлин.

Серед генів шляху p53 виявлено підвищення рівня експресії одного гену – *P16* – в DU145, зниження рівня експресії чотирьох генів: *CCNE1*, *TAGLN* – в LNCaP, PC3; *CCNB2*, *SOX4* – в LNCaP, а рівень експресії гену *TSC2* не змінюється. Шлях p53 – один із важливих сигнальних шляхів, регулюючих клітинний цикл,

апоптоз, репарацію ДНК. Протеїн p53 бере участь у попередженні виникнення пухлин за рахунок створення «геномної стабільності» та перешкоджання поділу клітин із мутаціями. Ген *TP53*, що інгібує циклін E1 (*CCNE1*) та циклін B2 (*CCNB2*), спричинює відповідно арест G1- та G2-фаз клітинного циклу. У більшості пухлин (молочної залози, шлунка, товстої кишки) знайдено підвищення рівня експресії *CCNE1* – однієї з головних кіназ переходу до S-фази циклу [22]. Експресія гену *CCNB2* також підвищена у низці пухлин [23]. Ген *P16* – це циклінзалежний інгібітор кінази, здатний індукувати арест G1- та G2-фаз клітинного циклу. Експресія цього гену в пухлинах простати, зазвичай, знижена (як у локалізованих, так і в метастазуючих) [24]. Проте в нашому дослідженні рівень експресії *P16* підвищується в одній клітинній лінії, одержаній з метастазуючої пухлини, що може вказувати

на додаткові механізми регуляції клітинного циклу. Ген *TAGLN* кодує протеїн цитоплазми трансгелін, який стабілізує актинові філаменти, зв'язуючись з фібрилами. На клітинній лінії простати LNCaP показано, що *TAGLN* індукує апоптоз за рахунок взаємодії з p53 [25]. Ген *SOX4* кодує транскрипційний фактор, який бере участь в ембріональному розвитку, а також індукує p53-опосередкований апоптоз. Його експресія в багатьох пухлинах, включаючи простату, підвищена [26]. Хоча в цьому дослідженні експресія *SOX4* знижена в клітинній лінії LNCaP, чутливій до андрогенів, що може свідчити про зниження апоптозу, залежного від p53. Аналіз експресії генів цього шляху вказує на переважне інгібування p53-залежного апоптозу в клітинних лініях LNCaP та PC3.

Серед генів клітинної адгезії шість генів із 20 виявляють знижені рівні експресії (*CDH1*, *EFNA5*, – в LNCaP, PC3; *SEMA3A* – в DU145; *CSPG4* – в усіх лініях; *CDK5* – в LNCaP; *FYN* – в LNCaP, DU145), у семи генів експресія не змінюється (*GLCE*, *MYO10*, *PKM2*, *RHOV*, *CAV1*, *ACTB*, *PLOD2*). Клітинна адгезія відіграє важливу роль у підтриманні багатоклітинних структур та в сигнальній трансдукції. Ген *CDH1* кодує кадгерин 1 (E-кадгерин). E-кадгерин є маркером епітеліальних клітин, а його значне зниження асоціюють з епітеліально-мезенхімальним переходом (ЕМП), який супроводжує розвиток пухлин та підвищення їх злоякісності [27]. Система клітинної адгезії включає сигнальний шлях β -1-інтегрину, що контролює взаємодію між клітинами. До цього шляху також належить хондроїтину сульфат протеоглікан 4, який кодується геном *CSPG4*. Інгібування експресії цього гену знижує лімфоангіогенез та неоваскуляризацію в ксенографтних пухлинах простати [28]. Для клітинної адгезії також важливим є сигналінг ефринів. Рецептори ефринів – родина рецепторів тирозинових кіназ, які є важливими для клітинної міграції, відштовхування та адгезії. Ген *EFNA5* кодує ефрин 5, що є лігандом рецептора тирозинових кіназ. Знайдено зниження рівня його експресії в хондросаркомах [29]. Ген *FYN* кодує нерцепторну протеїн-тирозинкіназу src-родини, яка регулює проліферацію клітин та їх виживання, інтегринопосередкований сигналінг, клітинну рухливість та імунну відповідь. Він є потенційним геном-супресором росту пух-

лин простати [30]. Загальне зниження експресії генів, що кодують протеїни клітинної адгезії, свідчить про втрату нормальних міжклітинних взаємодій.

Процесом, протилежним адгезії клітин, є акантоліз, коли для клітин адгезія неможлива. Відповідний баланс між цими двома процесами є важливим для морфогенезу клітин протягом ЕМП. ЕМП – процес зміни епітеліальними клітинами свого фенотипу на мезенхімальний, що супроводжується втратою клітинних взаємодій та епітеліальної апікально-базальної полярності та експресією мезенхімальних маркерів. Перехід є важливим для нормального ембріонального розвитку організму, регенерації тканин, проте він також супроводжує процеси формування злоякісних пухлин та метастазів [28]. Відома певна кількість пар «ліганд–рецептор», серед яких семафорин–плексин, які контролюють цей баланс. Ген *SEMA3A* кодує секретований семафорин III, який діє як супресор росту пухлин та інгібує клітинну міграцію та ангіогенез. Його експресія зазвичай знижена [31]. Ген *CDK5* кодує циклінзалежну кіназу 5, яка впливає на полімеризацію, динаміку актину і на клітинну міграцію. Експресію активатора цієї кінази (p35) знайдено в агресивних клітинних лініях простати та в клінічних зразках із метастазами [32]. Зниження експресії семафорину в DU145 свідчить про активізацію міграції та можливу втрату адгезії клітин.

Із семи генів системи сигнальної трансдукції клітин та транскрипційних факторів один ген мав підвищений рівень експресії (*HOXA13* – в PC3), два – знижений (*RASSF4* – в LNCaP, DU145; *NR5A2* – в LNCaP, PC3). Сигнальна трансдукція – це молекулярна система виявлення, посилення та інтеграції різноманітних зовнішніх сигналів для генерування відповідей, таких як зміна ензиматичної активності, експресія генів або іонна активність каналів тощо. Ген *RASSF4* кодує протеїн 4, що містить Ras-асоційований домен. Відомо, що деякі властивості Ras-протеїнів, зокрема інгібування росту, опосередковані через родину протеїнів RASSF (Ras – ефектори/супресори росту пухлин). Функцію цього гену ще повністю не вивчено, проте є відомості про його можливу участь у сигнальній трансдукції, що може запускати різні клітинні відповіді, зокрема апоптоз [33]. Зниження рівня експресії *RASSF4* може свідчити про інгібування RASSF-опосередкованого апоптозу.

Змін експресії зазнають і гени, які кодують транскрипційні фактори. Ген *HOXA13* кодує протеїн гомеобоксу A13, який бере участь в ембріональному розвитку та формуванні структур тіла, зокрема сечостатевої та репродуктивної систем, а також кінцівок. Було показано, що виживаність пацієнтів, хворих на карциному стравоходу, нижча у разі високого рівня експресії гену *HOXA13* порівняно з пацієнтами з низьким рівнем експресії цього гену [34]. Ген *NR5A2* кодує ядерний рецептор підродино 5, групи A (член 2). Він бере участь в ембріональному розвитку. Рівень експресії цього гену підвищений у 45% карцином молочної залози та корелює з експресією рецептора естрогенів [35]. Проте роль цих транскрипційних факторів у формуванні пухлин простати ще мало вивчена.

Серед генів, що асоційовані з інвазивністю та метастазуванням, чотири гени показали зниження рівнів експресії (*PLAU*, *SERPINE1*, *SERPINE2a* – в LNCaP, DU145; *SERPINE2b* – в усіх лініях), а один ген (*SI00A4* – в LNCaP, DU145) – підвищення рівня експресії. Ген *PLAU* кодує активатор плазміногену урокіназного типу (урокіназу). Ген *SERPINE1* кодує інгібітор урокінази 1 (PAI-1). Протеїн *SERPINE1* інгібує активність матричних металопротеїназ, що є важливим для переходу злоякісних клітин через базальну ламіну (інвазивність). За даними літератури, в клітинних лініях DU145 та PC3, одержаних з агресивних пухлин простати, відбувається зниження експресії *SERPINE1* та підвищення експресії *PLAU* порівняно з лініями клітин PrEC та LNCaP [36]. Ген *SERPINE2* кодує інгібітор плазміногенного активатора 2 (PN-1) та є фактором коагуляції, що інактивує тканинний активатор плазміногену (tPA) і урокіназу [37]. Протеїн цього серпінового інгібітору має декілька ізоформ, зокрема *SERPINE2a* та *SERPINE2b*. В цьому дослідженні виявлено зниження експресії інгібіторів урокінази (*SERPINE1*, *SERPINE2a*, *SERPINE2b*), що може свідчити про активізацію інвазивності та метастазування. Експресія *PLAU* в LNCaP, DU145 знижена, а в лінії клітин PC3 – не змінюється.

З досліджуваних генів ангіогенезу у двох підвищується рівень експресії (*IL8* – в DU145, PC3; *CXCL2* – в DU145), у трьох – знижується (*MME*, *CXCL1* – в усіх лініях; *CXCL6* – в LNCaP, DU145). Ген *MME* кодує мембранну металоендопептидазу, яка бере участь у деградації

фізіологічно активних пептидів (брадикінін, окситоцин, нейротензин та ін.), що робить неможливим подальше зв'язування їх із рецептором андрогенів (AR) та інгібується подальший розвиток агресивних метастазуючих пухлин. За даними досліджень на лініях клітин простати було показано відсутність експресії *MME* в клітинах PC3 та значну експресію в клітинах LNCaP [38]. Проте в нашому дослідженні зниження рівня експресії *MME* відбувається у всіх трьох лініях раку простати, а найбільше зниження спостерігається саме в лініях, одержаних з агресивних пухлин. Гени *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL6* кодують відповідні хемокіни. Ці хемокіни є проангіогенними факторами та медіаторами запалення. Підвищення їх експресії знайдено в багатьох видах пухлин, включаючи простату [20]. У нашому разі тільки ген *CXCL2* виявляє підвищену експресію в лінії клітин DU145.

Серед досліджуваних генів системи клітинної проліферації та репарації для одного гену було показано підвищений рівень експресії (*P16* – в DU145), для чотирьох – знижений (*PCNA*, *CCNB2* – в LNCaP; *CCNE1* – в LNCaP, PC3; *HBEGF* – в усіх лініях), а два гени експресувались на однаковому рівні (*Ki67*, *RNASET2*). Ген *PCNA* кодує ядерний антиген проліферуючих клітин. В клітинній лінії LNCaP експресія гену *PCNA* спричинена взаємодією з ядерним рецептором андрогенів (AR) [39]. Проте в дослідженні експресія гену *PCNA* знижується в LNCaP, що може свідчити про зниження експресії AR. В цьому експерименті не виявлено змін експресії гену *Ki67*, який є маркером проліферації клітин. Це може бути пояснено приблизно однаковою швидкістю проліферації клітин у культурах. Багато сигнальних шляхів впливають на регуляцію клітинного циклу. Було вивчено гени контролю клітинного циклу, які є мішенями шляху p53 (*CCNB2*, *CCNE1*, *P16*). Інформацію про них наведено вище. Ген *HBEGF* кодує гепаринзв'язуючий EGF-подібний фактор росту – ліганд до рецептора тирозинових кіназ ERBB/EGFR (епідермальний рецептор ростових факторів), що регулює проліферацію та диференціацію клітин ссавців. В лінії простати ARCaP(E) знайдено підвищення експресії *HBEGF* за рахунок активації переносника цинку (*LIV1*) [40]. Зниження експресії в досліджуваних клітинних лініях може свідчити про інші механізми регуляції цього гену.

Таблиця 2. Гени, експресія яких змінюється в клітинних лініях, одержаних з агресивних пухлин

Гени	Клітинні лінії			Секреція протеїну	Гени	Клітинні лінії			Секреція протеїну
	LNCaP	DU145	PC3			LNCaP	DU145	PC3	
	Підвищення експресії					Зниження експресії			
<i>IL8</i>	0	4,8	5,8	так	<i>MME*</i>	6,1	4179,2*	18,0	ні
<i>CXCL2</i>	0	4,5	0	так	<i>IL6</i>	0	0	44,8	так
<i>PI6</i>	0	4,3	0	ні	<i>CXCL1</i>	116,3	16,0	10,0	так
<i>HOXA13</i>	0	0	7,4	ні	<i>SERPINE2b*</i>	7,3	424,0*	BE	так
<i>ILIRL1</i>	0	0	15,1	ні	<i>CCNE1</i>	4,1	0	11,5	ні
<i>IL1B</i>	21,0	0	445,7	так	<i>TAGLN</i>	4,5	0	10,0	ні
					<i>IL1B</i>	0	15,4*	0	так

На підставі одержаних даних про рівні відносної експресії генів було вибрано гени, експресія яких відрізняється в андрогенчутливих та андрогеннечутливих клітинних лініях і які відрізняються ступенем агресивності. Дані представлено в табл. 2.

Ці гени входять до систем ангіогенезу, інвазивності та метастазування, контролю клітинного циклу. Відібрані гени є основою подальших досліджень та розробки панелі маркерів для діагностики агресивного раку простати. За даними літератури, для них було перевірено наявність секретованого протеїну (табл. 2), як одного з факторів, важливих для діагностичних цілей.

Із проведеного аналізу експресії генів можна дійти висновку про особливості експресії генів у клітинних лініях раку простати порівняно з лінією нормальних епітеліальних клітин. Із 65 досліджуваних генів знайдено зміни експресії для 29 генів у клітинній лінії LNCaP, для 20 генів – у DU145 та для 16 генів – у PC3. У клітинній лінії LNCaP простежується інгібування класичного Wnt-шляху. У клітинних лініях LNCaP та PC3 виявлено інгібування p53-опосередкованого апоптозу. Зниження експресії гену *SEMA3A* може свідчити про активізацію сигнальних шляхів, контролюючих міграцію клітин. В усіх лініях раку простати простежується епітеліально-мезенхімальний перехід, який виявляється в зниженні рівня експресії генів клітинної адгезії (*CDH1*, *CSPG4*, *EFNA5*, *FYN*) та епітеліальних маркерів (*CDH1*). Також у клітинних лініях раку простати простежується активація сигнальних шляхів, відповідальних за інвазивність, метастазування та ангіогенезу. Підтвердженням цьо-

го може бути підвищення рівня експресії генів *S100A4*, *IL8* та зниження рівня експресії генів-інгібіторів серпінових пептидаз (*SERPINE1*, *SERPINE2a*, *SERPINE2b*). Таким чином, основними сигнальними шляхами, що зазнають найбільших змін експресії генів, протягом переходу від неагресивних до агресивних типів раку простати, змодельованому на клітинних лініях, є адгезія клітин, інвазивність та метастазування. Відібрано низку генів, експресія яких відрізняється в андрогенчутливих та андрогеннечутливих клітинних лініях, які потребують підтвердження із застосуванням інших методів як на рівні мРНК, так і на рівні протеїну, та можуть бути використані для подальшої розробки діагностичних панелей інвазивних та метастазуючих пухлин простати.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В НОРМАЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ И КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ РАКА ПРОСТАТЫ ЧЕЛОВЕКА

Е. Э. Розенберг, А. В. Геращенко,
В. И. Кашуба

Государственная ключевая лаборатория молекулярной и клеточной биологии, Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев
e-mail: y.e.rozenberg@imbg.org.ua

Рак простаты – одна из главных причин смертности у мужчин с злокачественными новообразованиями. Актуальной проблемой является поиск биомаркеров рака простаты, которые

позволяли бы отличать агрессивные метастазирующие опухоли от латентных. Целью данной работы было исследование уровня экспрессии генов в модельных линиях нормальных эпителиальных клеток PNT2 и клеточных линиях рака простаты человека – LNCaP, DU145 и PC3, полученных из разных по степени агрессивности и метастазирования опухолей простаты, для поиска дифференциально-экспрессированных генов, которые позволят создать панель маркеров для прогноза агрессивности и метастазирования опухолей. В представленной работе методом количественной ПЦР (к-ПЦР) была определена относительная экспрессия 65 генов, связанных с канцерогенезом. Изменения экспрессии найдены для 29 генов в клеточной линии LNCaP, для 20 – в DU145 и для 16 генов – в PC3 по сравнению с нормальной клеточной линией простаты PNT2. Анализ экспрессии генов позволяет говорить об эпителиально-мезенхимальном переходе, который включает в себя потерю эпителиальных маркеров, снижение клеточной адгезии и повышение миграции. Среди этих генов найден ряд дифференциально-экспрессированных генов в клеточных линиях рака простаты, полученных из разных по степени агрессивности опухолей. Показано, что наибольшим изменениям подвергаются гены клеточной адгезии (*FYN*, *EFNA5*), инвазивности и метастазирования (*IL8*, *CXCL2*), а также контроля клеточного цикла (*PI6*, *CCNE1*). Эти гены могут быть использованы для создания диагностических панелей для инвазивных метастазирующих опухолей простаты.

Ключевые слова: рак простаты человека, андрогеннезависимый, андрогензависимый рак простаты, метастазирование, биомаркеры, клеточные линии, экспрессия генов, сигнальные пути.

COMPARATIVE ANALYSIS OF GENE EXPRESSION IN NORMAL AND CANCER HUMAN PROSTATE CELL LINES

E. E. Rosenberg, G. V. Gerashchenko, V. I. Kashuba

State Key Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: y.e.rozenberg@imbg.org.ua

Prostate cancer is one of the main causes of mortality in men with malignant tumors. The urgent problem was a search for biomarkers of prostate cancer, which would allow distinguishing between aggressive metastatic and latent tumors. The aim of this work was to search for differentially expressed genes in normal epithelial cells PNT2 and prostate cancer cell lines LNCaP, DU145 and PC3, produced from tumors with different aggressiveness and metastatic ability. Such genes might be used to create a panel of prognostic markers for aggressiveness and metastasis. Relative gene expression of 65 cancer-related genes was determined by the quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR). Expression of 29 genes was changed in LNCaP cells, 20 genes in DU145 and 16 genes in PC3 cell lines, compared with normal line PNT2. The obtained data make it possible to conclude that the epithelial-mesenchymal cell transition took place, which involved the loss of epithelial markers, reduced cell adhesion and increased migration. We have also found few differentially expressed genes among 3 prostate cancer cell lines. We have found that genes, involved in cell adhesion (*CDH1*), invasiveness and metastasis (*IL8*, *CXCL2*) and cell cycle control (*PI6*, *CCNE1*) underwent most changes. These genes might be used for diagnosis and prognosis of invasive metastatic prostate tumors.

Key words: human prostate cancer, androgen-independent, androgen-dependent prostate cancer, metastasis, biomarkers, cell lines, gene expression, signal pathways.

1. Ferlay J., Shin H. R., Bray F. et al. // GLOBOCAN Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. – 2008. – 2.0, N 10.
2. Федоренко З. П., Гулак Л. О., Михайлович Ю. Й та ін. Бюлетень національного канцер-ресстру України №14 “Рак в Україні, 2011-2012”. – К., 2013. – С. 22.
3. Tai S., Sun Y., Squires J. M. et al. // Prostate. – 2011. – **71**, N 15. – P. 1668–1679.
4. Alimirah F., Chen J., Basrawala Z. et al. // FEBS Lett. – 2006. – **580**, N 9. – P. 2294–300.
5. Pulukuri S. M., Gondi C. S., Lakka S. S. et al. // J. Biol. Chem. – 2005. – **280**, N 43. – P. 36529–36540.
6. Stone K. R., Mickey D. D., Wunderli H. et al. // Int. J. Cancer. – 1978. – **21**, N 3. – P. 274–81.
7. Ghosh A., Wang X., Klein E., Heston W. D. // Cancer Res. – 2005. – **65**, N 3. – P. 727–731.
8. Mori R., Wang Q., Danenberg K. D. et al. // Prostate. – 2008. – **68**, N 14. – P. 1555–1560.
9. Pfaffl M. W. // Nucleic Acids Res. – 2001. – **9**, N 29. – P. 2002–2007.
10. Gerashchenko G. V., Bogatyrova O. O., Rudenko E. E. et al. // Exp. Oncol. – 2010. – **32**, 2. – P. 7–75.
11. Rudenko E. E., Gerashchenko G. V., Lapska Y. V. et al. // Biopolym. Cell. – 2013. – **29**, N 5. – P. 395–401.
12. Kondratov A. G., Kvasha S. M., Stoliar L. A. et al. // PLoS One. – 2012. – **7**, N 10. – e47012.
13. Ni M., Chen Y., Fei T. et al. // Genes Dev. – 2013. – **27**, N 7. – P. 734–748.
14. Katoh M. // Int. J. Oncol. – 2012. – **41**, N 6. – P. 1913–1918.
15. Lodish H., Berk A., Zipursky S. L. et al. Molecular Cell Biology. – New York: 2000. Section 22.1, Cell-Cell Adhesion and Communication. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21599/>
16. Sottnik J. L., Keller E. T. // Curr. Mol. Med. – 2013. – **13**, N 4. – P. 626–639.
17. Takezako N., Hayakawa M., Hayakawa H. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. – **341**, N 2. – P. 425–432.
18. Singh R. K., Lokeshwar B. L. // Mol. Cancer. – 2009. – **8**. – P. 57.
19. Dluzniewski P. J., Wang M. H., Zheng S. L. et al. // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2012. – **21**, N 10. – P. 1774–1782.
20. Killian P. H., Kronska E., Michalik K. M. et al. // Carcinogenesis. – 2012. – **33**, N 12. – P. 2507–2519.
21. Hsieh H. L., Schäfer B. W., Weigle B., Heizmann C. W. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004. – **316**, N 3. – P. 949–959.
22. Aggarwal B. B., Banerjee S., Bharadwaj U. et al. // Biochem. Pharmacol. – 2007. – **73**, N 7. – P. 1024–1032.
23. Mo M. L., Chen Z., Li J. et al. // Int. J. Biol. Markers. – 2010. – **25**, N 4. – P. 236–242.
24. Yao Q., He X. S., Zhang J. M. et al. // Zhonghua Nan Ke Xue. – 2006. – **12**. – P. 28–31.
25. Zhang Z. W., Yang Z. M., Zheng Y. C., Chen Z. D. // Asian J. Androl. – 2010. – **12**. – P. 186–195.
26. Pan X., Zhao J., Zhang W. N. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – **106**, N 10. – P. 3788–3793.
27. Thierry J. P., Aclouque H., Huang R. Y., Nieto M. A. // Cell. – 2009. – **139**, N 5. – P. 871–890.
28. Ozerdem U. // Prostate. – 2006. – **66**, N 3. – P. 294–304.
29. Kalinski T., Ropke A., Sel S. et al. // Hum. Pathol. – 2009. – **40**, N 12. – P. 1679–1685.
30. Sørensen K. D., Borre M., Ørntoft T. F. et al. // Int. J. Cancer. 2008 – **122**, N 3. – P. 509–519.
31. Blanc V., Nariculam J., Munson P. et al. // Prostate. – 2011. – **71**, N 6. – P. 649–658.
32. Strock C. J., Park J. I., Nakakura E. K. et al. // Cancer Res. – 2006. – **66**, N 15. – P. 7509–7515.
33. Eckfeld K., Hesson L., Vos M. D. et al. // Cancer Res. – 2004. – **64**, N 23. – P. 8688–8693.
34. Shen L. Y., Chen K. N. // Cancer Lett. – 2011. – **312**, N 1. – P. 18–23.
35. Chand A. L., Wijayakumara D. D., Knowler K. C. et al. // PLoS One. – 2012. – **7**, N 2. – e31593.
36. Hagelgans A., Menschikowski M., Fuessel S. et al. // Exp. Mol. Pathol. – 2013. – **94**, N 3. – P. 458–465.
37. McKee C. M., Xu D., Muschel R. J. // Oncotarget. – 2013. – **4**, N 1. – P. 1–2.
38. Patrikidou A., Vlachostergios P. J., Voutsadakis I. A. et al. // Cancer Cell Int. – 2011. – **11**, N 1. – P. 13.
39. Murthy S., Wu M., Bai V. U. et al. // PLoS One. – 2013. – **8**, N 2. – e56692.
40. Lue H. W., Yang X., Wang R. et al. // PLoS One. – 2011. – **6**, N 11. – e27720.

Отримано 24.05.2013