

УДК 577.2; 577.29; 57.021

Участие $\alpha 5$ -цепи ламининов в регуляции процесса дифференцировки клеток колоректального рака

© 2019 Д. В. МАЛЬЦЕВА^{1, 2, *}, М. П. РАЙГОРОДСКАЯ², И. М. ЦЫПИНА^{1, 3}, А. ТУРЧИНОВИЧ^{4, 5}, В. Г. ЗГОДА⁶, С. В. НИКУЛИН^{2, 7}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997

²Научно-технический центр «БиоКлиникум», Москва, 115088

³Национальный исследовательский университет Высшая школа экономики, Москва, 101000

⁴SciBerg e.Kfm, 68309, Mannheim, Germany

⁵Molecular Epidemiology C080, German Cancer Research Center, 69120, Heidelberg, Germany

⁶ФГБУН Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича, Москва, 119121

⁷Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, 690091

*e-mail: dmaltseva@gmail.com

Поступила в редакцию 08.10.2019 г.

После доработки 31.10.2019 г.

Принята к публикации 11.11.2019 г.

Исследовано влияние эндогенной экспрессии $\alpha 5$ -цепи ламининов на фенотип клеток колоректального рака. Для этого был осуществлен нокдаун экспрессии гена *LAMA5*, кодирующего $\alpha 5$ -цепь ламининов, в клетках линии колоректальной аденокарциномы HT29. Данные изменения профиля экспрессии генов как на уровне мРНК, так и на уровне белка, свидетельствуют о вовлеченности $\alpha 5$ -цепи ламининов в регуляцию процесса дифференцировки клеток. Так, наблюдалось снижение экспрессии таких маркеров дифференцировки эпителия кишечника, как *SI*, *KRT20*, *ANXA13*, *MUC13*. Кроме того детектировалось увеличение экспрессии маркеров стволовых клеток эпителия кишечника *LRG5* и трансмембранного белка CD44. Изменение фенотипа клеток HT29 может быть следствием влияния $\alpha 5$ -цепи ламининов на активность Wnt-сигнального пути.

Ключевые слова: колоректальный рак, ламинин, дифференцировка, дедифференцировка, маркер стволовых клеток, HT29, *LAMA5*, *LRG5*

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-6-3-11

Ламинины – семейство молекул клеточной адгезии, которые представляют собой гетеротримерные α -, β -, γ -гликопротеины, способные самополимеризоваться на поверхности клетки, формируя базальную мембрану [1]. Взаимодействие ламининов с клеточной мембраной происходит преимущественно через связывание α -цепи с ламинин-специфичными рецепторами (интегрины, белок Лютеран, 67 кДа белок, α -дистрогликан и др.).

Следствием этого взаимодействия является активация внутриклеточных сигналов, регулирующих важнейшие процессы жизнедеятельности как нормальных, так и опухолевых клеток. Важная роль ламининов отмечается на всех основных стадиях процесса метастазирования [2]. Более того, экспрессия отдельных цепей ламининов обладает прогностической значимостью для различных типов опухолей [3]. Недавно было показано, что в

Список сокращений: ДТТ – 1,4-дитиотриэтол; кДНК – комплементарная одноцепочечная ДНК; ПРЦ-РВ – полимеразная цепная реакция с детекцией продуктов в режиме реального времени; *LAMA4* – ген, кодирующий $\alpha 4$ -цепь ламининов; *LAMA5* – ген, кодирующий $\alpha 5$ -цепь ламининов; RIN – параметр качества тотальной РНК (RNA integrity number); ТСЕР – трис-(2-карбокситил)-фосфин; shRNA – короткая шпилечная РНК.

случае колоректального рака высокое соотношение экспрессии генов, кодирующих $\alpha 4$ - и $\alpha 5$ -цепь ламининов (*LAMA4/LAMA5*) ассоциировано с неутешительным прогнозом у пациентов [4]. Возможным объяснением этого, помимо изменения физических свойств базальной мембраны, например образование более плотной и жесткой полимерной «сетки» при увеличении содержания $\alpha 5$ -цепи ламининов [2], может являться изменение свойств самих опухолевых клеток при изменении состава ламининовых тримеров. Ранее отмечалось, что присутствие $\alpha 5$ -цепи ламининов в базальной мембране способствует образованию более плотных контактов между клетками эндотелия [5]. Изменение профиля экспрессии цепей ламининов отмечается при трансформации эпителиальных клеток в мезенхимальные [2, 6]. Показано, что ламинин 511, содержащий $\alpha 5$ -цепь, играет важную роль в морфогенезе и дифференцировке эпителия тонкого кишечника мышей [7].

Цель настоящей работы – оценить влияние $\alpha 5$ -цепи ламининов на свойства клеток колоректального рака человека путем нокдауна гена *LAMA5* в клетках линии HT29.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Реактивы и материалы

1x DPBS («ПанЭко», Россия); питательная среда для культивирования клеток McCoy's 5A (Gibco, США); фетальная бычья сыворотка FBS (Gibco); 100x раствор антибиотиков пенициллина и стрептомицина Pen Strep (Gibco); раствор трипсина-ЭДТА 0,25% с солями Хенкса («ПанЭко»); культуральные флаконы и 96-луночные планшеты (TPP, Швейцария); набор для колориметрического измерения количества белка Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США); N-гидроксиметиламинометан гидрохлорида (Tris-HCl) (AppliChem, Германия); двухзамещенная натриевая соль ЭДТА (AppliChem); 1,4-дителиотриэтол (ДТТ) (Panreac, Германия); трис-(2-карбокситил)-фосфин (ТСЕФ) (Sigma, США); иодацетоамид (Sigma); триэтиламмония бикарбоната (Sigma); кальция хлорида (AppliChem); трипсин (Promega, США); муравьиная кислота (Sigma); ацетонитрил (Sigma); хроматографическая колонка C18 Acclaim® RepMap™ RSLC с внутренним диаметром 75 мкм, длиной 15 см (Thermo Fisher Scientific).

Культивирование клеточных культур и нокдаун гена *LAMA5*

Нокдаун гена *LAMA5*, кодирующего $\alpha 5$ -цепь ламининов, в клетках линии колоректальной

аденокарциномы HT29 осуществляли путем трансдукции клеток лентивирусными частицами, содержащими shRNA, комплементарную к последовательности гена *LAMA5* (HT29-shLAMA5) [8]. Эффективность нокдауна определяли так же в соответствии с ранее описанной методикой [8]. В качестве контроля использовали линию HT29, трансдуцированную лентивирусными частицами, содержащими «бессмысленную» shRNA, последовательность которой не является комплементарной ни к одному из генов человека (HT29-shCtrl) [8].

Оценка изменения профиля экспрессии генов с использованием микрочипов

Оценку изменения профиля экспрессии генов в клетках линии HT29 проводили с помощью микрочипов Gene Chip Human Transcriptome Array 2.0 (Affymetrix, США). Выделение, анализ качества и количества РНК проводили, как было описано ранее [9]. Значение RIN для всех образцов было выше 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, как описано в [10]. Гибридизацию, промывание, окрашивание и сканирование микрочипов проводили по описанной ранее методике [11, 12]. Обработку CEL-файлов, полученных при сканировании микрочипов, проводили с помощью программного пакета Transcriptome Analysis Console 2.0 [13]. 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 по логарифмической шкале Affymetrix. Гены, для которых уровень сигнала был ниже, рассматривались как неэкспрессирующиеся.

Оценка экспрессии генов методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ)

Подтверждение изменений экспрессии генов, обнаруженных в результате микрочипового анализа, проводили методом ПЦР-РВ [14]. Для синтеза кДНК использовали 500 нг РНК на одну реакцию. Подбор последовательностей праймеров (табл. 1), оценку эффективности и специфичности праймеров проводили так же, как описано было ранее [15, 16]. Для нормирования полученных значений ПЦР-РВ использовали референсные гены *ACTB*, *EEF1A1* и *HUWE1* [17]. Разницу уровней экспрессии генов в клетках линий HT29-shCtrl и HT29-shLAMA5 рассчитывали по методу $\Delta\Delta Ct$ [18]. Реакцию ПЦР для каждого гена в каждом образце выполняли в трех повторностях и проводили анализ изменения экспрессии генов для каждого независимого

Последовательности олигодезоксинуклеотидных праймеров, используемые для оценки экспрессии генов методом ПЦР-РВ, и значения эффективности реакции ПЦР

The sequences of oligodeoxynucleotide primers used to evaluate gene expression by qPCR and the values of qPCR efficiency

Ген	Последовательность	Эффективность
<i>ACTB</i>	f-5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3' r-5'-AAGGGACTTCCTGTAACAACGCA-3'	1,95±0,06
<i>ANXA13</i>	f-5'-CAAGCAGTTACGAGCCACSTTTCA-3' r-5'-CTCCTCATCGGTCCCCGCAC-3'	2,08±0,10
<i>CDH1</i>	f-5'-CGACACCCGATTCAAAGTGG-3' r-5'-TCCCAGGCGTAGACCAAGAA-3'	1,97±0,10
<i>EEF1A1</i>	f-5'-CCCTAAAAGCCAAAATGGGAAA-3' r-5'-TAGTGGTGGACTTGCCCGAAT-3'	1,98±0,15
<i>HUWE1</i>	f-5'-GCCTGACCTGAGTGGGTAGTG-3' r-5'-CACACTGCTCCAACAGCTTCC-3'	1,97±0,07
<i>KRT20</i>	f-5'-CTCCTCATCGGTCCCCGCAC-3' r-5'-ACACGACCTTGCCATCCACTACT-3'	1,91±0,09
<i>MUC13</i>	f-5'-AGACTGCGGATGACTGCCTCA-3' r-5'-CATTGCTTGTGCTGTGCGTTGC-3'	1,88±0,07
<i>SI</i>	f-5'-AGCAGTTCTTATGGGGTCCAGCA-3' r-5'-CGAGCATTGGGGACGTAGGC-3'	2,10±0,10
<i>SOX4</i>	f-5'-ATGACCCGAGAACCCCGTTGG-3' r-5'-TGACCGTGAACCCCTTCCA-3'	2,01±0,10
<i>VEGFA</i>	f-5'-TGGCAGAAGGAGGAGGGCAG-3' r-5'-AGGGGCACACAGGATGGCTT-3'	2,02±0,07

биологического повтора. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием *t*-критерия Стьюдента и при помощи открытого он-лайн ресурса для статистической обработки экспериментальных данных <https://www.socscistatistics.com/tests/chisquare2/default2.aspx> (T-Test Calculator for 2 Independent Means, 2019). В качестве статистически значимых рассматривали изменения со значением $p < 0,05$.

Подготовка проб для анализа масс-спектрометрическим методом

Клетки линии HT29 культивировались стандартным способом во флаконе 25 см² до состояния 80% конfluence. Затем клетки снимали с поверхности флакона обработкой раствором трипсин-ЭДТА, центрифугировали, полученный осадок клеток промывали три раза в 10 мл DPBS. После последнего центрифугирования осадок с клетками замораживали в жидком азоте. Экстракцию тотального белка и гидролитическое расщепление проводили следующим образом. К пробам клеток (~ 6 млн), добавляли по 1 мл лизирующего буфера, содержащего 3% натриевой соли дезоксихолиевой кислоты и 100 мМ Tris HCl (pH 7,4) и

инкубировали во льду в течение 30 мин. Полученную суспензию обрабатывали ультразвуком с помощью прибора со шупом Vandelin Sonopuls (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Германия) с мощностью 30% максимальной мощности прибора в течение 1 мин. Затем центрифугировали при 10000 об/мин и 4 °С. Супернатант отбирали и измеряли концентрацию общего белка с помощью реагента BCA. Объем пробы, содержащий 100 мкг белка, растворяли в денатурирующем буфере, содержащем 12 мМ натриевой соли дезоксихолиевой кислоты, 2 М тиомочевины, 2,5 мМ ЭДТА натриевой соли двухзамещенной и 75 мМ Tris-HCl (N-гидрокси метиламинометан гидрохлорида) с pH 8,2. Далее к полученному раствору добавляли ДТТ и ТСЕР до конечной концентрации 87 мМ и 6,7 мМ соответственно. После перемешивания пробу инкубировали при температуре 44 °С в течение 60 мин. Затем добавляли раствор иодацетоамида до конечной концентрации 50 мМ, инкубировали в течение 60 мин в недоступном для света месте.

После восстановления и ацетилирования к пробе добавляли буфер для трипсинолиза (pH 8,0), состоящий из 42 мМ триэтиламония

бикарбоната и 3 мМ кальция хлорида и раствор трипсина (200 нг/мкл) в соотношении 1:100 по массовой доле содержащегося белка. После инкубации в течение 2 ч при 37 °С к пробе добавляли 5 мкл концентрированной муравьиной кислоты, перемешивали и центрифугировали при g 13148 в течение 10 мин. Надосадочную жидкость отбирали и анализировали масс-спектрометрическим методом.

Масс-спектрометрический анализ

На хроматографическую колонку C18 со скоростью потока 0,3 мкл/мин наносили 1 мкг пептидов в объеме 1 мкл в течение 12 мин в подвижной фазе С (2%-ный ацетонитрил, 0,1%-ная муравьиная кислота) и разделяли с помощью HPLC-хроматографии (Ultimate 3000 Nano LC System, Thermo Scientific). Элюцию пептидов проводили с использованием градиента буфера В (80%-ный ацетонитрил, 0,1%-ная муравьиная кислота) со скоростью потока 0,3 мкл/мин. Общее время анализа составило 130 мин, из них на уравнивание колонны буфером А (0,1%-ная муравьиная кислота) – 12 мин, градиент от 5 до 35% буфера В – 95 мин, для достижения 99%-ного буфера В – 6 мин, на промывание 99%-ным буфером В – 10 мин и для уравнивания колонки буфером А – 7 мин. Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре Q-exactive HFX в режиме положительной ионизации с использованием источника NESI (Thermo Scientific), при напряжении на эмиттере 2,1 кВ и температуре капилляра 240 °С. Панорамное сканирование проводили в диапазоне масс от 300 m/z до 1500 m/z, при разрешении 120 000. При тандемном сканировании разрешение устанавливали 15 000 в диапазоне масс от 100 m/z до верхней границы, которая определяется автоматически исходя из массы прекурсора, но не более 2000 m/z. Изоляцию прекурсорных ионов проводили в окне ± 1 Да. Максимальное число разрешенных для изоляции ионов в режиме MS2 было установлено как ≤ 40 , при этом граница отсечения для выбора прекурсора для тандемного анализа была установлена как 50 000 ед., а нормализованная энергия соударения (NCE) была равна 29. Для тандемного сканирования учитывали только ионы с $z = 2+...6+$ по зарядному состоянию. Максимальное время накопления для прекурсорных ионов составило 50 мс, для фрагментных ионов – 110 мс. Величину AGC для прекурсоров и фрагментных ионов устанавливали 1×10^6 и 2×10^5 , соответственно. Все измеренные прекурсоры динамически исключались из тандемного MS/MS анализа на 90-й с.

Оценка дифференциально экспрессированных белков

Количественную оценку содержания белков проводили с использованием программного обеспечения Progenesis IQ (Waters, США), с параметрами, предлагаемыми производителем.

Идентификацию белков проводили с помощью программы SearchGUI v.3.3.1 [19] и базы данных HumanDB (UniProt Release 2018_05) со следующими поисковыми параметрами: расщепляющий фермент – трипсин, точность определения масс моноизотопных пептидов ± 5 ppm, точность определения масс в спектрах MS/MS ± 25 ppm и возможность пропуска одного сайта расщепления. Алкилирование цистеинов было учтено как фактор модификации пептидов. Окисление метионинов учитывали из-за возможной модификации пептидов. Частота встречаемости ложно-положительных результатов для пептидов и белков $< 1\%$.

Для оценки дифференциально экспрессированных белков, полученные первичные данные были проанализированы при помощи программного обеспечения MaxQuant 1.6 (алгоритм iBAQ). Дальнейшую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Perseus и языка программирования R 3.5 с интегрированной средой разработки RStudio 1.1. Для определения статистической достоверности наблюдаемых различий использовали t-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нокдаун гена *LAMA5* в клетках линии HT29

Клеточная линия HT29 является стандартной моделью в исследованиях колоректального рака. Как описывалось ранее, клетки HT29 характеризуются преимущественно эпителиальным фенотипом с некоторыми мезенхимальными признаками [20]. Другой особенностью этой линии является ее гетерогенность, поскольку она одновременно содержит клетки, продуцирующие муцин-подобный матрикс, и клетки, способные при определенных условиях дифференцироваться в энтероциты тонкого кишечника [21]. Отмечается также, что дифференцировка клеток HT29 является обратимой, что, по-видимому, указывает на некоторую пластичность этих клеток, т.е. способность изменять свои свойства, перемещаясь по оси «стволовые клетки—дифференцированные клетки» как в одну, так и в другую сторону. В соответствии с современными представлениями механизма метастазирования, именно такие характеристики опухолевых клеток в комбинации с эпителиально-мезенхимальной пластичностью обеспечивают их диссеминацию

от первичного опухолевого узла, выживание в условиях чужеродного окружения и последующее формирование новых очагов заболевания – метастазов [22–24]. Огромная роль в этом процессе отводится внеклеточному матриксу, окружающему опухолевые клетки, изменению его состава и свойств [10, 25, 26]. В настоящей работе исследовалась эндогенная экспрессия $\alpha 5$ -цепи ламининов и ее влияние на характеристики клеток колоректального рака на примере линии HT29.

По морфологическим характеристикам клетки HT29-shLAMA5 с нокдауном гена *LAMA5* и контрольные клетки HT29-shCtrl были близки (рис. 1), что свидетельствовало о том, что критической перестройки в клетках не произошло.

Для того чтобы детально изучить влияние ингибирования эндогенной экспрессии $\alpha 5$ -цепи ламининов был проведен сравнительный анализ профиля экспрессии генов в клетках HT29-shLAMA5 и HT29-shCtrl с помощью микрочипов. Количество пробетов (наборов проб на микрочипе, соответствующих конкретным генам), интенсивность свечения которых различалась в 2 или более раза в образцах HT29-shLAMA5 и HT29-shCtrl, составило 57, из которых 37 соответствовали генам, кодирующим белки. Небольшое количество дифференциально экспрессированных генов свидетельствуют о том, что нокдаун гена *LAMA5* оказал мягкое воздействие на клетки HT29, и критической перестройки в них не произошло. Однако среди дифференциально экспрессированных генов были обнаружены маркеры дифференцировки эпителия кишечника: *KRT20*, *MUC13*, *ANXA13* [27–29], экспрессия которых снижалась в результате нокдауна *LAMA5* (табл. 2). Достоверное изменение ($p < 0,05$) этих генов было подтверждено

методом ПЦР-РВ. Уровень экспрессии еще одного гена маркера дифференцировки энтероцитов *SI*, находился ниже предела чувствительности микрочипов, однако по данным ПЦР-РВ экспрессия этого гена также уменьшалась (табл. 2). Среди дифференциально экспрессированных генов представляют интерес гены *NDRG1* и *BGN*, экспрессия которых снижалась (табл. 2). *NDRG1* (N-myc downstream-regulated gene 1) является важным регулятором прогрессии опухолевых заболеваний, в том числе процесса метастазирования, ингибирует эпителиально-мезенхимальную трансформацию клеток колоректального рака [30, 31]. Кроме того, в клетках различных типов опухолей происходит увеличение экспрессии *NDRG1* в ответ на сигналы дифференцировки [32]. Ген *BGN* кодирует бигликан, компонент внеклеточного матрикса, который также может выполнять роль сигнальной молекулы [33]. Так, взаимодействуя с LRP6, ко-рецептором рецепторов семейства Frizzled (Wnt-рецепторы), бигликан активирует канонический сигнальный путь Wnt [34]. Отметим, что Wnt-сигнальный путь – важнейший регулятор самообновления и поддержания свойств стволовых клеток, процесса дифференцировки, поляризации клеток, эмбриогенеза [35].

Группу генов, экспрессия которых возросла в результате нокдауна гена *LAMA5*, представляют *DDIT3*, *DDIT4*, *DEPTOR* и *SESN2* (табл. 2). Каждый из этих генов кодирует белок, ингибирующий активность важного регулятора метаболизма и гомеостаза клетки mTROC1 [36, 37]. Потеря клетками активности комплекса mTROC1 приводит к появлению у них свойств плюрипотентности, и, наоборот, активность комплекса mTROC1 крайне важна для дифференцировки клеток [38].

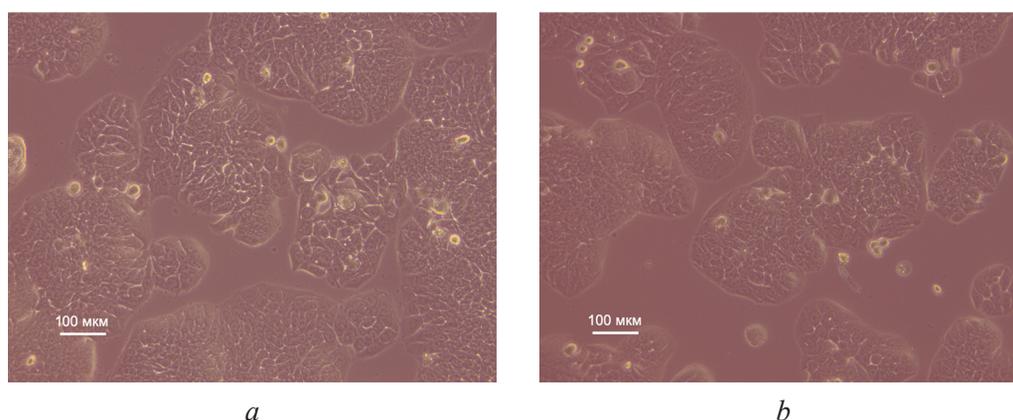


Рис. 1. Клетки контрольной линии HT29-shCtrl (a) и линии HT29-shLAMA5 с нокдауном гена *LAMA5* (b). Показано отсутствие морфологических различий

Fig. 1. Cells of the control line HT29-shCtrl (a) and the cells of the line HT29-shLAMA5 with knockdown of the *LAMA5* gene (b). The absence of morphological differences between the cells

Изменение экспрессии генов в клетках HT29 в результате нокдауна гена *LAMA5*Gene expression changes in HT29 cells in response to the knockdown of *LAMA5* gene

Ген	Функция	Кратность изменения экспрессии		
		Микрочипы	ПЦР-РВ	Протеом
<i>ANXA13</i>	Маркер дифференцировки эпителия кишечника	-3,0	-2,0	-11,8
<i>KRT20</i>		-1,8	-1,4	-3,4
<i>MUC13</i>		-1,7	-1,8	нд
<i>SI</i>		нд	-2,0	нд
<i>BGN</i>	Участие в дифференцировке стволовых клеток	-2,2	-	нд
<i>NDRG1</i>		-2,1	-	нд
<i>LRG5</i>	Маркер стволовых клеток кишечника	1,6	-	нд
<i>CD44</i>		1,0	-	1,4
<i>DDIT3</i>	Ген белка, ингибирующего активность комплекса mTORC1	1,9	-	1,4
<i>DDIT4</i>		2,9	-	нд
<i>DEPTOR</i>		1,6	-	нд
<i>SESN2</i>		2,2	-	нд
<i>CDH1</i>	Ген, ассоциированный с эпителиально-мезенхимальной трансформацией	-1,3	-1,4	нд
<i>MMP7</i>		1,8	-	1,0
<i>SOX4</i>		1,9	1,5	нд
<i>VEGFA</i>		1,8	1,4	нд
<i>VCAM</i> (Лютеран)	Рецепторы ламининов	1,0	-	2,6
<i>ITGA6</i>		1,0	-	1,8
<i>ITGB4</i>		1,0	-	-1,8
<i>PSMD5</i>	Ингибитор протеасомы	1,0	-	12,2

Примечание: Отрицательное значение показывает, что экспрессия соответствующего гена в клетках HT29-shLAMA5 ниже, чем в клетках HT29-shCtrl. нд – экспрессия гена не детектируется указанным методом. «-» – данные отсутствуют. Значения кратности изменения экспрессии, полученные методом ПЦР-РВ для генов *SOX4* и *VEGFA* даны при $p < 0,1$.

Note: Negative value means that the expression of the corresponding gene in HT29-shLAMA5 cells is lower than in HT29-shCtrl cells. «нд» means that gene expression is not detected by this method.«-» indicates that there is no data for this gene. For *SOX4* and *VEGFA* $p < 0,1$

Еще одна важная особенность mTORC1 заключается в тесной связи его сигнальных каскадов с Wnt-сигнальным путем [38].

Кроме того, в клетках HT29-shLAMA5 детектировалась повышенная экспрессия гена *LGR5* (табл. 2), кодирующего R-spondin-рецептор – хорошо известный маркер стволовых клеток эпителия кишечника [39]. Связывание рецептора *LGR5* со своим лигандом ингибирует активность трансмембранных убиквитинлигаз *ZNRF3* и *RNF43*, что способствует аккумуляции Frizzled-рецепторов Wnt-пути на поверхности клетки [40].

Таким образом, данные сравнительного транскриптомного анализа клеток HT29-shLAMA5 и HT29-shCtrl свидетельствуют о том, что нокдаун гена *LAMA5* связан с частичной дедифференцировкой клеток, сдвигом их характеристик на оси «стволовые (плюрипотентные клетки)–полностью дифференцированные клетки» в сторону стволовых клеток. Это согласуется с данными работы [41], в которой было показано, что у мышей с нокаутом гена *LAMA5* наблюдалось нарушение

дифференцировки эпителия кишечника. В работе также отмечалась важная роль Wnt-сигнального пути в этом процессе.

Анализ экспрессии генов, ассоциированных с эпителиально-мезенхимальной трансформацией выявил некоторые изменения для генов *CDH1*, *MMP7*, *SOX4* и *VEGFA* (табл. 2), однако, существенной трансформации эпителиально-мезенхимального статуса клеток, очевидно, не произошло. Не исключено, что изменение экспрессии данных генов может быть ответом на сигналы дедифференцировки.

Сравнительный анализ протеома клеток линий HT29-shLAMA5 и HT29-shCtrl

На следующем этапе работы был проведен сравнительный анализ протеома клеток линий HT29-shLAMA5 и HT29-shCtrl с помощью масс-спектрометрического анализа. Достоверно детектировано в обеих линиях было 1399 белков. Из них 87 белков различались в исследуемых линиях в 2 или более раз ($p < 0,05$). Таким образом, на уровне

протеома, ингибирование экспрессии $\alpha 5$ -цепи ламининов также оказало достаточно мягкое воздействие на клетки. Пересечение списков генов, кодирующих дифференциально экспрессированные белки, и дифференциально экспрессированных генов выявило шесть общих. Небольшое число общих генов, по-видимому, обусловлено в первую очередь тем, что масс-спектрометрический анализ белков позволяет детектировать преимущественно те белки, содержание которых в клетке наиболее высокое. Однако, большинство белков, для которых было детектировано изменение экспрессии кодирующих их генов, таковыми не являются. Также стоит отметить возможную роль посттранскрипционной регуляции экспрессии, например с помощью регуляции трансляции посредством микроРНК или регуляции деградации белкового продукта [42–44]. Тем не менее, важно, что среди дифференциально экспрессированных белков оказались маркеры дифференцировки эпителия кишечника (аннексин 13 и цитокератин 20), кодируемые генами *ANXA13* и *KRT20*, соответственно, уменьшение количества мРНК которых было детектировано при анализе транскриптома (табл. 2). На уровне белка степень снижения их экспрессии оказалось даже больше, чем на уровне мРНК (в 11,8 и 3,4 раза для аннексина 13 и цитокератина 20, соответственно). Также наблюдалось увеличение экспрессии в 1,4 раза трансмембранного белка CD44 – одного из известных маркеров стволовых клеток.

По данным протеома в клетках HT29-shLAMA5 детектировалось повышенное (в 2,6 раза) содержание белка Лютеран – рецептора специфичного для ламининов, содержащих $\alpha 5$ -цепь. Кроме того, наблюдалось увеличение в 1,8 раза экспрессии $\alpha 6$ -цепи интегринов и снижение в 1,8 раза экспрессии $\beta 4$ -цепи интегринов, которые входят в состав двух других рецепторов ламининов: интегринов $\alpha \beta 4$ и $\alpha \beta 1$. Поскольку экспрессия $\beta 1$ -цепи интегринов не изменялась, можно предположить, что в результате нокдауна гена *LAMA5*, в клетках происходит перераспределение рецепторов ламининов, что в свою очередь может приводить к изменению запускаемых ими внутриклеточных сигналов.

Представляет интерес также и падение в 12,2 раза содержания белка PSMD5 – субъединицы, ингибирующей активность 26S-протеасомы. Ранее отмечалось, что ингибирование экспрессии гена белка PSMD5 ассоциировано со злокачественным преобразованием клеток эпителия кишечника [45].

В заключении можно сделать вывод, что нокдаун гена *LAMA5* ассоциирован с частичной дифференцировкой клеток линии колоректально-

го рака HT29. Данные, полученные в исследовании, указывают на то, что возможным механизмом изменения фенотипа клеток может быть изменение активности Wnt-сигнального пути. Таким образом, снижение эндогенной экспрессии $\alpha 5$ -цепи ламининов может способствовать, снижению степени дифференцированности клеток колоректального рака, что в свою очередь может обуславливать более агрессивные свойства опухоли.

Исследование протеома проводилось с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Протеом человека» (ИБМХ).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-14-01338).

ЛИТЕРАТУРА

1. Domogatskaya A., Rodin S., Tryggvason K. Functional diversity of laminins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2012, 28, 523–553.
2. Maltseva D.V., Rodin S.A. Laminins in metastatic cancer. *Mol. Biol.*, 2018, 52, 350–371.
3. Qin Y., Rodin S., Simonson O.E., Hollande F. Laminins and cancer stem cells: Partners in crime? *Semin. Cancer Biol.*, 2017, 45, 3–12.
4. Galatenko V.V., Maltseva D.V., Galatenko A.V., Rodin S., Tonevitsky A.G. Cumulative prognostic power of laminin genes in colorectal cancer. *BMC Med. Genomics*, 2018, 11, 9.
5. Song J., Zhang X., Buscher K., et al. Endothelial basement membrane laminin 511 contributes to endothelial junctional tightness and thereby inhibits leukocyte transmigration. *Cell Rep.*, 2017, 18, 1256–1269.
6. Pastushenko I., Brisebarre A., Sifrim A., et al. Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature*, 2018, 556, 463–468.
7. Mahoney Z.X., Stappenbeck T.S., Miner J.H. Laminin alpha 5 influences the architecture of the mouse small intestine mucosa. *J. Cell Sci.*, 2008, 121, 2493–502.
8. Maltseva D.V., Raigorodskaya M.P., Belyakova G.A., Turchinovich A. The effect of endogenous expression of the laminin alpha5 chain on chemotherapy resistance of colorectal cancer cells. *Biotekhnologiya*, 2019, 35(5), 29–35.
9. Oliveira-Ferrer L., Rößler K., Haustein V., et al. c-FOS suppresses ovarian cancer progression by changing adhesion. *Br. J. Cancer*, 2014, 110, 753–763.
10. Khaustova N.A., Maltseva D.V., Oliveira-Ferrer L., et al. Selectin-independent adhesion during ovarian cancer metastasis. *Biochimie*, 2017, 142, 197–206.

11. Sakharov D.A., Maltseva D.V., Riabenko E.A., et al. Passing the anaerobic threshold is associated with substantial changes in the gene expression profile in white blood cells. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 2012, 112, 963–972.
12. Kudriaeva A., Galatenko V., Maltseva D.V., et al. The transcriptome of type I murine astrocytes under interferon-Gamma exposure and remyelination stimulus. *Molecules*, 2017, 22, 808.
13. Shkurnikov M.Y., Knyazev E.N., Wicklein D., et al. Role of L1CAM in the regulation of the canonical Wnt pathway and class I MAGE Genes. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2016, 160, 807–810.
14. Maltseva D.V., Krainova N.A., Khaustova N.A., et al. Biodistribution of viscumin after subcutaneous injection to mice and *in vitro* modeling of endoplasmic reticulum stress. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2017, 163, 451–455.
15. Shkurnikov M.Y., Maltseva D.V., Knyazev E.N., Alekseev B.Y. Expression of stroma components in the lymph nodes affected by prostate cancer metastases. *Mol. Biol.*, 2018, 52, 701–706.
16. Krainova N.A., Khaustova N.A., Makeeva D.S., et al. Evaluation of potential reference genes for qRT-PCR data normalization in HeLa cells. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2013, 49, 743–749.
17. Maltseva D.V., Makarova J.A., Raygorodskaya M.P., Rodin S.A. Effects of laminins 332 and 411 on the epithelial–mesenchymal status of colorectal cancer cells. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2019, 166, 377–382.
18. Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.*, 2006, 27, 95–125.
19. Barsnes H., Vaudel M. SearchGUI: A highly adaptable common interface for proteomics search and de novo engines. *J. Proteome Res.*, 2018, 17, 2552–2555.
20. Maltseva D.V., Makarova J.A., Khristichenko A.Y., et al. Epithelial to mesenchymal transition marker in 2D and 3D colon cancer cell cultures in the presence of laminin 332 and 411. *Mol. Biol.*, 2019, 53, 291–298.
21. Gout S., Marie C., Lainé M., et al. Early enterocytic differentiation of HT-29 cells: biochemical changes and strength increases of adherens junctions. *Exp. Cell Res.*, 2004, 299, 498–510.
22. Chaffer C.L., Weinberg R.A. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 2011, 331, 1559–1564.
23. Lange T., Samatov T.R., Tonevitsky A.G., Schumacher U. Importance of altered glycoprotein-bound N- and O-glycans for epithelial-to-mesenchymal transition and adhesion of cancer cells. *Carbohydr. Res.*, 2014, 389, 39–45.
24. Samatov T.R., Shkurnikov M.U., Tonevitskaya S.A., Tonevitsky A.G. Modelling the metastatic cascade by *in vitro* microfluidic platforms. *Prog. Histochem. Cytochem.*, 2015, 49, 21–29.
25. Leight J.L., Drain A.P., Weaver V.M. Extracellular matrix remodeling and stiffening modulate tumor phenotype and treatment response. *Annu. Rev. Cancer Biol.*, 2017, 1, 313–334.
26. Samatov T.R., Wicklein D., Tonevitsky A.G. L1CAM: Cell adhesion and more. *Prog. Histochem. Cytochem.*, 2016, 51, 25–32.
27. Zhou Q., Toivola D.M., Feng N., et al. Keratin 20 helps maintain intermediate filament organization in intestinal epithelia. *Mol. Biol. Cell*, 2003, 14, 2959–2971.
28. Simmini S., Bialecka M., Huch M., et al. Transformation of intestinal stem cells into gastric stem cells on loss of transcription factor Cdx2. *Nat. Commun.*, 2014, 5, 5728.
29. Wice B.M., Gordon J.I. A strategy for isolation of cDNAs encoding proteins affecting human intestinal epithelial cell growth and differentiation: characterization of a novel gut-specific N-myristoylated annexin. *J. Cell Biol.*, 1992, 116, 405–422.
30. Ma J., Gao Q., Zeng S., Shen H. Knockdown of NDRG1 promote epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer via NF- κ B signaling. *J. Surg. Oncol.*, 2016, 114, 520–527.
31. Mi L., Zhu F., Yang X., et al. The metastatic suppressor NDRG1 inhibits EMT, migration and invasion through interaction and promotion of caveolin-1 ubiquitylation in human colorectal cancer cells. *Oncogene*, 2017, 36, 4323–4335.
32. Ellen T.P., Ke Q., Zhang P., Costa M. NDRG1, a growth and cancer related gene: regulation of gene expression and function in normal and disease states. *Carcinogenesis*, 2007, 29, 2–8.
33. Wang H., Sun W., Ma J., et al. Biglycan mediates suture expansion osteogenesis via potentiation of Wnt/ β -catenin signaling. *J. Biomech.*, 2015, 48, 432–440.
34. Aggelidakis J., Berdiaki A., Nikitovic D., et al. Biglycan regulates MG63 osteosarcoma cell growth through a LPR6/ β -catenin/IGFR-IR signaling axis. *Front. Oncol.*, 2018, 8, 470.
35. Yang Y. Wnt signaling in development and disease. *Cell Biosci.*, 2012, 2, 14.
36. Saxton R.A., Sabatini D.M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*, 2017, 168, 960–976.
37. Maiese K. Molecules to Medicine with mTOR: Translating Critical Pathways into Novel Therapeutic Strategies. Elsevier Inc., 2016, 1–454.
38. Maiese K. Novel stem cell strategies with mTOR. *Mol. to med. with mTOR transl. crit. pathways into nov. Ther. Strateg.* Elsevier Inc., 2016, 3–22.
39. Philpott A., Winton D.J. Lineage selection and plasticity in the intestinal crypt. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2014, 31, 39–45.
40. Zhan T., Rindtorff N., Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, 2017, 36, 1461–1473.
41. Ritié L., Spenlé C., Lacroute J., et al. Abnormal Wnt and PI3Kinase signaling in the malformed intestine of lama5 deficient mice. *PLoS One.*, 2012, 7, e37710.

42. Makarova J.A., Maltseva D.V., Galatenko V.V., et al. Exercise immunology meets miRNAs. *Exerc. Immunol. Rev.*, 2014, 20, 135–164.
43. Makarova J.A., Shkurnikov M.U., Wicklein D., et al. Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Prog. Histochem. Cytochem.*, 2016, 51, 33–49.
44. Makarova J.A., Shkurnikov M.U., Turchinovich A.A., et al. Circulating microRNAs. *Biochem.*, 2015, 80, 1117–1126.
45. Levin A., Minis A., Lalazar G., et al. Molecular cell biology PSMD5 inactivation promotes 26S proteasome assembly during colorectal tumor progression. *Cancer Res.*, 2018, 78, 3458–3468.

Participation of Laminin α 5-Chain in the Regulation of Colorectal Cancer Cell Differentiation

D. V. MALTSEVA^{1,2,*}, M. P. RAIGORODSKAYA², I. M. TSY PINA^{1,3}, A. TURCHINOVICH^{4,5}, V. G. ZGODA⁶, and S. V. NIKULIN^{2,7}

¹*Shemyakin--Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

²*Bioclinicum Scientific Research Center, Moscow, 115088 Russia*

³*Higher School of Economics National Research University, Moscow, 101000 Russia*

⁴*SciBerg e.Kfm, Mannheim, 68309 Germany*

⁵*Molecular Epidemiology C080, German Cancer Research Center, Heidelberg, 69120 Germany*

⁶*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, 119121 Russia*

⁷*Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690091 Russia*

**e-mail: dmaltseva@gmail.com*

Received October 8, 2019

Revised October 31, 2019

Accepted November 11, 2019

Abstract—The effect of endogenous expression of the laminin α 5 chain on the phenotype of colorectal cancer cells has been studied. For this purpose, the knockdown of *LAMA5* gene coding for the α 5 laminin chain in the HT29 colorectal adenocarcinoma cell line was carried out. The data on gene expression at both mRNA and protein levels indicate that the α 5 laminin chain is involved in the regulation of cell differentiation. For example, a decrease in the expression of such markers of differentiation of the intestinal epithelium as *SI*, *KRT20*, *ANXA13* and *MUC13* was observed. In addition, the expression of the intestinal epithelial stem cell marker *LRG5* and CD44 transmembrane protein was increased. Changing the phenotype of HT29 cells may be a result of the effect of the laminin α 5 chain on the activity of the Wnt signaling pathway.

Key words: colorectal cancer, laminin, differentiation, dedifferentiation, intestinal epithelium stem cell marker, HT29, *LAMA5*, *LRG5*

Funding—The study was funded by the Russian Science Foundation (Project no. 17-14-01338).

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-6-3-11