

УДК 577.218

СВЕРХЭКСПРЕССИЯ СЕЛЕНОПРОТЕИНА SelK В РАКОВЫХ КЛЕТКАХ BGC-823 ПРИВОДИТ К ИНГИБИРОВАНИЮ ИХ СПОСОБНОСТИ К АДГЕЗИИ И МИГРАЦИИ

© 2015 С.Б. Бен^{1,3}, Б. Пенг¹, Г.С. Ванг¹, С. Ли²,
Х.Ф. Гу¹, Х. Джянг³, К.Л. Менг², Б.Д. Лее⁴, С.Л. Чен^{2*}

¹ School of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036,
China; E-mail: bensongbin007@163.com

² School of Pharmaceutical Science, Liaoning University,
Shenyang 110036, China; E-mail: chenchanglanbio@aliyun.com

³ Departments of Pediatrics and Medicine, University of Colorado
School of Medicine, Aurora, CO, USA; E-mail: hua.jiang@ucdenver.edu

⁴ Laboratory of Molecular Genetics and Genomics, School of Biological
Sciences, Institute of Molecular Biology and Genetics, Seoul
National University, Seoul 151-742, Korea;
E-mail: imbgimg@plaza.snu.ac.kr

Поступила в редакцию 16.03.15

После доработки 07.06.15

В представленной работе было исследовано влияние селенопротеина SelK человека на способность клеток линии BGC-823 рака желудка человека к адгезии в Матригеле и к миграции, изученной методом трансмембранного перехода клеток. Было установлено, что при сверхэкспрессии рекомбинантного белка SelK в клетках BGC-8 их способность к адгезии значительно снижалась по сравнению с нетрансфицированными клетками, не экспрессирующими этот белок ($p < 0,01$). При этом катастрофически падала также и способность этих клеток к миграции ($p < 0,01$). Было установлено, что при сверхэкспрессии усеченной с C-конца формы белка SelK (ct-SelK) клетки обладали почти такой же способностью к адгезии и к миграции, как и исходные нетрансфицированные BGC-8. В то же время исследования, проведенные на клетках линии HEK-293 почек эмбриона человека, показали, что при сверхэкспрессии белка SelK или его усеченной формы способности клеток к адгезии или миграции были примерно одинаковыми ($p > 0,05$). Помимо влияния на адгезию и миграцию сверхэкспрессия селенопротеина SelK сопровождалась снижением жизнеспособности культуры клеток BGC-8 (определено колориметрическим тестом с использованием МТТ) и индукцией апоптоза (определяли методами конфокальной микроскопии и проточной цитофлуориметрии). С использованием проточной цитофлуориметрии было также установлено, что в цитозоле этих клеток повышался уровень свободных ионов Ca^{2+} . В то же время сверхэкспрессия SelK в клетках HEK-293 не приводила ни к существенному снижению их жизнеспособности, ни к индукции апоптоза, и лишь только уровень свободного кальция в цитозоле заметно возрастал. Все полученные нами результаты свидетельствуют о том, что SelK может ингибировать способность раковых клеток человека к адгезии на Матригеле и к миграции, снижать жизнеспособность трансфицированных клеток и индуцировать их апоптоз. Сопровождающий эту сверхэкспрессию выход Ca^{2+} из эндоплазматического ретикула может являться одним из механизмов воздействия селенопротеина K на все эти процессы. Мы установили, что все вышеперечисленные эффекты на клетки оказывает только полноразмерный белок SelK, поскольку сверхэкспрессия усеченного с C-конца селенопротеина K не приводила к аналогичным результатам. Эмбриональные клетки человека не реагировали столь радикально, как раковые, на повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле, а следовательно, они имели более широкий диапазон устойчивости к подобным колебаниям концентрации этих ионов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: селенопротеин, SelK, раковые клетки, адгезия, миграция, кальциевый гомеостаз.

Селен выполняет важную роль в функционировании антиоксидантов, метаболизме тиреоидных гормонов, поддержании мужской фер-

тильности, иммунных процессах и развитии мышечной ткани [1–8]. Недостаток селена может приводить к появлению различных заболе-

Принятые сокращения: ФИТЦ – флуоресцеинизотиоцианат; BGC-823 – линия клеток рака желудка человека; HEK-293 – линия клеток почек эмбриона человека; LNCaP – карцинома лимфатических узлов простаты; МТТ – 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н тетразолий бромид; PC3, DU145 – линии клеток карциномы простаты человека; SelK, SelS, SelT, SelN – селенопротеины K, S, T, N; Sep15 – селенопротеин с молекулярной массой 15 кДа.

* Адресат для корреспонденции.

ваний, таких как болезнь Кешана, иммунной недостаточности, нейродегенерации, заболеваний сердечно-сосудистой системы и раку [5, 9, 10]. Селен обнаруживается в составе селенопротеинов и в форме селеноцистеина, расположенного в активном центре ферментов [7].

Существуют различные виды селенопротеинов у животных. Двадцать пять из них были идентифицированы у млекопитающих и тридцать пять — у всех животных вместе взятых [8, 11]. Большинство селенопротеинов существуют как растворимые белки цитозоля и являются ключевыми ферментами антиоксидантной или других систем. Семь селенопротеинов у млекопитающих локализованы в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), в т.ч. Sep15 и SelK, -M, -S, -N и -T [12–14]. Эти белки выполняют различные функции в клетках. Например, Sep15 принимает участие в контроле сворачивания (фолдинга) белков в ЭР, SelS — в ретротранслокации неправильно свернутых белков из ЭР в цитозоль, SelT и SelN регулируют кальциевый гомеостаз [14]. Однако не все функции селенопротеинов выяснены к настоящему времени. Так, было продемонстрировано, что SelK млекопитающих важен для протекания процесса выхода Ca^{2+} из ЭР во время активации клеток иммунной системы [15]. Показано также, что этот белок имеет высокое сродство к дерлину-1 (degradation in endoplasmic reticulum protein 1) и принимает участие в дерлинзависимом экстрагировании неправильно свернутых белков из ЭР в цитозоль [16]. Однако функции SelK в раковых клетках человека не были полностью выяснены, хотя и было продемонстрировано, что «нокдаун» этого белка в клетках гепатокарциномы HepG2 приводил к апоптозу, индуцируемому агентами ЭР-стресса, и к гибели клеток [17].

Биологические функции dSelK, гомолога белка SelK у *D. melanogaster*, были изучены ранее различными методами: анализом на микрочипах, ПЦР в режиме реального времени, конфокальной сканирующей микроскопии и др. [18]. Было установлено, что сверхэкспрессия dSelK в клетках S2 у *D. melanogaster* приводила к выходу ионов кальция из ЭР и увеличению уровня свободного Ca^{2+} в цитозоле [18].

Целью представленной работы было исследование воздействия человеческого SelK на раковые клетки путем изучения влияния этого белка на способность клеток человека BGC-823 к миграции и адгезии на Матригеле; в качестве контрольных были выбраны эмбриональные клетки человека HEK-293. Было установлено, что сверхэкспрессия SelK в клетках BGC-823 ингибировала их миграцию и адгезию. Одновременно SelK индуцировал в этих клетках апоптоз.

Сверхэкспрессия усеченной с C-конца формы этого белка не приводила ко всем вышеназванным изменениям. Предполагается, что повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле является механизмом, лежащим в основе индукции апоптоза белком SelK в раковых клетках BGC-823.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Клетки *Escherichia coli* DH5 α и плаزمиды pDsRed2-N1 были подарены проф. Лее из Сеульского государственного университета Южной Кореи. Плазмиды pDsRed2-C1-SelK была создана в нашей лаборатории на основе плазмиды pDsRed2-C1 [18]. Клетки линии BGC-823 рака желудка человека и клетки линии HEK-293 почек эмбриона человека были получены от представителя Коллекции клеточных структур Китайской академии наук в Шанхае. Также в работе использовали липофектамин 2000, среду RPMI-1640 и фетальную сыворотку крупного рогатого скота («Invitrogen», США); пенициллин и стрептомицин («Solabio», Китай); камеру с двумя отделениями, разделенными пористой мембраной, для изучения клеточной миграции сквозь мембрану («Corning», США); Матригель («American BD Company», США); Fluo-3/AM («Biotium», США); hoechst 33342 и набор Annexin V-FITC («Neobioscience Technology», Китай); наборы для экстракции плазмид, экстракции гелей и ПЦР («Axygen», США); ДНК-полимеразу Taq, различные мономерные dNTP, рестриктазы XhoI, EcoRI, NheI, KpnI, ДНК-лигазу T4 и набор маркеров для определения молекулярных масс ДНК («TaKaRa», Китай).

Конструирование плазмиды, кодирующей усеченный белок SelK. Усеченная последовательность ДНК, не кодирующая C-концевую часть белка SelK, была получена методом ПЦР с использованием праймеров P1ctF/P1ctR, спроектированных на основе полноразмерной последовательности SelK мРНК. P1ctF (прямой праймер): 5'-CGAGCTCGCCACCATGGTTTACATCTCGAACGGACA-3' (подчеркнут участок рестрикции SacI), P1ctR (обратный праймер): 5'-GGGGTACCTGGCCSTCTTCCATCATCATA-3' (подчеркнут участок рестрикции KpnI). Праймеры были синтезированы фирмой «Sangon Biotech» (Китай). В усеченной с C-конца форме белка SelK (ct-SelK) отсутствовало 28 аминокислотных остатков в C-концевой части молекулы. ПЦР проводили с использованием в качестве матрицы плазмиды pDsRed2-C1-SelK, кодирующей полноразмерный белок SelK. Очищенные продукты ПЦР, содержащие последовательность, кодирующую усеченный белок SelK, бы-

ли расщеплены рестриктазами SacI и KpnI и встроены в плазмиду pDsRed2-N1 по соответствующим комплементарным участкам. Результирующий вектор экспрессии был назван pDsRed2-N1-ct-SelK. Структура вставки из плазмиды была подтверждена путем двойной рестрикции с помощью SacI и KpnI и последующим секвенированием последовательности ДНК этой вставки.

Выращивание клеток и их кратковременная трансфекция. Клетки BGC-823 и НЕК-293 культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10%-ную фетальную сыворотку и по 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина, при 37° в атмосфере 5%-ного CO₂. Трансфекцию выполняли с использованием липофектамина 2000 в соответствии с инструкцией производителя.

Определение адгезии клеток на Матригеле. Клетки BGC-823 и НЕК-293 трансфицировали плазмидой pDsRed2-C1-SelK (полноразмерный ген *SelK*), pDsRed2-N1-ct-SelK (усеченная форма) или pDsRed2-N1 («пустая» плазида) в течение 48 ч в 6-луночных планшетах. В это время готовили покрытые Матригелем 96-луночные микропланшеты. Сначала их обрабатывали Матригелем (50 мкг/мл) в течение 1 ч при 37°. Затем жидкость удаляли из лунок и проводили блокирование 2%-ным БСА в течение 1 ч при 37°. Трансфицированные клетки собирали с использованием трипсина, ресуспендировали в среде 1640 и высевали в покрытые Матригелем микропланшеты в количестве 1×10^5 клеток в лунку. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°, жидкость из лунок удаляли и промывали их буфером PBS для удаления неприкрепившихся клеток. К прикрепленным клеткам добавляли культуральную среду и раствор МТТ (по 100 и 10 мкл в лунку соответственно) и инкубировали в течение 3 ч при 37°. Жидкость из лунок удаляли и растворяли образовавшийся краситель в ДМСО (по 100 мкл в лунку) в течение 10 мин при встряхивании. Значение поглощения при 570 нм в лунке было пропорционально количеству прикрепившихся клеток.

Тестирование клеточной миграции. Миграцию трансфицированных клеток BGC-823 и НЕК-293 изучали методом трансмембранного перехода. Трансфицированные клетки собирали путем трипсинизации монослоя, действие трипсина нейтрализовали добавлением культуральной среды 1640 с 10%-ной сывороткой, а клеточную суспензию центрифугировали при 200 g в течение 5 мин и ресуспендировали в среде 1640 с 1%-ной сывороткой до концентрации 2×10^6 клеток/мл. Камеры с двумя отделениями, разделенными пористой мембраной (диаметр пор 8 мкм), помещали в 24-луночный планшет, содержащий среду 1640 с 20%-ной сывороткой (по 600 мкл в

лунку), высевали клетки на верхнюю сторону мембраны и инкубировали в течение 24 ч при 37°. По окончании инкубации клетки с верхней поверхности мембраны удаляли механически, а клетки на нижней поверхности фиксировали метанолом в течение 30 мин, промывали буфером PBS и окрашивали 0,1%-ным кристаллическим фиолетовым в течение 20 мин. Окрашенные клетки тщательно промывали водой и подсчитывали с использованием флуоресцентного микроскопа.

Изучение жизнеспособности клеточных культур с использованием МТТ. Количество живых клеток BGC-823 и НЕК-293 оценивали в МТТ-тесте [19]. Жизнеспособность культур трансфицированных клеток выражали в процентах относительно жизнеспособности контрольных не трансфицированных клеток, принятой за 100%.

Детектирование апоптоза с использованием hoechst 33342. Клетки выращивали на покровных стеклах в пластиковых лунках микропланшетов и трансфицировали соответствующими плазмидами, как было описано выше. После этого клетки дважды промывали буфером PBS и окрашивали их ДНК с использованием hoechst 33342 в течение 5 мин при 37°. Морфологию окрашенных клеточных ядер исследовали с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа МТС-600 («Bio-Rad», США). Цитоплазму клеток исследовали после окрашивания Fluo-3/AM, образующим флуоресцирующий комплекс со свободными ионами Ca²⁺, как это описано ниже.

Детектирование апоптоза методом проточной цитофлуориметрии. Детектирование проводили после окраски клеток с помощью конъюгата аннексин V–ФИТЦ, взаимодействующего с фосфатидилсеринем на поверхности клеточной мембраны [20]. Клетки BGC-823 и НЕК-293 трансфицировали соответствующими плазмидами в течение 48 ч, собирали и ресуспендировали в 100 мкл 1× буфера для связывания из соответствующего набора до конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл. Затем клетки окрашивали конъюгатом аннексин V–ФИТЦ (5 мкл в 200 мкл 1× буфера для связывания) в течение 10 мин при 37°. Проточную цитофлуориметрию проводили с использованием цитофлуориметра FACScan («Becton-Dickinson», США). Дот-плоты были построены следующим образом: значения FL1 (интенсивность зеленой флуоресценции ФИТЦ) представлены на оси абсцисс, FL2 (интенсивность красной флуоресценции тега dsRed, являющегося красным флуоресцирующим белком) – на оси ординат. Было проанализировано по меньшей мере по 10 000 клеток из каждого образца. Обработка данных проводилась с ис-

пользованием программы Cell Quest («Becton-Dickinson»).

Определение уровня свободного кальция внутри клеток методом проточной цитофлуориметрии. Уровень свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле клеток BGC-823 и HEK-293 определяли путем окрашивания с помощью красителя Fluo-3/AM, образующего с этими ионами комплекс Fluo-3- Ca^{2+} , зеленую флуоресценцию которого наблюдали с помощью проточного цитофлуориметра. Интенсивность эмиссии флуоресценции этого комплекса была пропорциональна концентрации свободного Ca^{2+} в цитозоле [21]. Через 48 ч после трансфекции клеточный монослой разрушали смесью трипсин-ЭДТА, клетки дважды промывали ледяным буфером PBS, собирая их центрифугированием. Затем клетки ресуспендировали в 300 мкл среды 1640 в отсутствие сыворотки и антибиотиков и инкубировали с 5 мкл Fluo-3/AM в течение 30 мин при 37°. По окончании инкубации клетки вновь промывали 2×300 мкл PBS и анализировали с помощью проточного цитофлуориметра. Дот-плоты строили следующим образом: значения FL1 (интенсивность зеленой флуоресценции Fluo-3) представляли на оси абсцисс, FL2 (интенсивность красной флуоресценции dsRed) – на оси ординат.

Статистический анализ. Полученные данные анализировали одномерным ANOVA, а статистическую значимость различий между трансфицированными и контрольными группами кле-

ток определяли по *t*-критерию Стьюдента. Все данные были представлены как средние значения \pm s.d. Статистическая значимость различий между группами клеток и высота степени значимости рассматривались при уровне значений $p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сверхэкспрессия белка SelK в клетках BGC-823 приводит к нарушению их способности к адгезии на Матригеле. Способность раковых клеток к адгезии на внеклеточном матриксе является важным условием метастазирования злокачественных опухолей. Как следует из рис. 1, А, после сверхэкспрессии полноразмерного белка SelK (группа клеток SelK) в раковых клетках BGC-823 трансфицированные клетки демонстрировали существенно более низкую способность к адгезии на Матригеле по сравнению с нетрансфицированными клетками (Con1), с клетками, в которых был сверхэкспрессирован усеченный белок SelK (ct-SelK), или с клетками, трансфицированными «пустой» плазмидой pDsRed2-N1, несущей только репортерный ген красной флуоресцирующего белка (Con2) ($p < 0,01$). Несмотря на то, что сверхэкспрессия ct-SelK в клетках BGC-823 приводила к некоторому уменьшению уровня адгезии этих клеток, степень редукции адгезивной способности клеток была незначи-

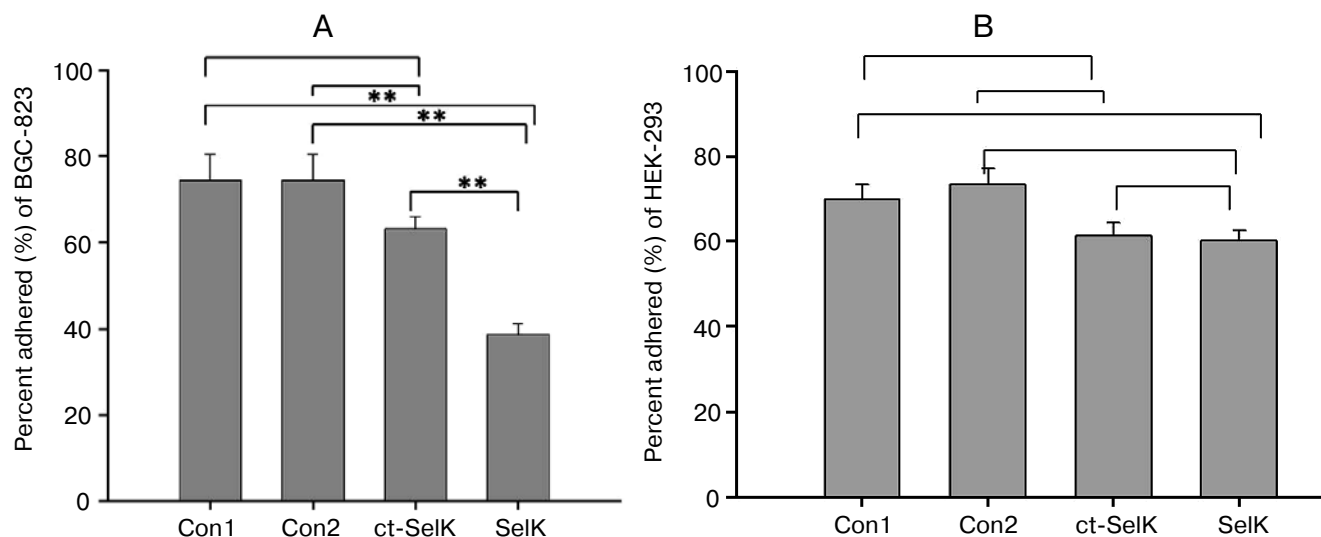


Рис. 1. Влияние сверхэкспрессии селенопротеина К на сцепление клеток BGC-823 и HEK-293 с Матригелем. А – Адгезию раковых клеток BGC-823 при сверхэкспрессии в них полноразмерного селенопротеина К (SelK) или его усеченной с С-конца формы (ct-SelK) анализировали через 48 ч после трансфекции. Нетрансфицированные клетки (Con1) и клетки, трансфицированные «пустой» плазмидой pDsRed2-N1, несущей ген красной флуоресцирующего белка (Con2); В – адгезия эмбриональных клеток HEK-293, трансфицированных, соответственно, теми же плазмидами, что и клетки BGC-823. Все данные представлены как средние значения \pm s.d. по трем экспериментам; ** $p < 0,01$

тельной по сравнению с контролями Con1 и Con2 (в обоих случаях $p > 0,05$). Эти данные показывают, что активным являлся только полноразмерный SelK. В то же время эмбриональные клетки линии HEK-293, в которых был сверхэкспрессирован полноразмерный SelK, не демонстрировали существенного падения способности к адгезии по сравнению с клетками ct-SelK или Con2 ($p > 0,05$), а только лишь по сравнению с нетрансфицированными клетками Con1 ($p < 0,05$).

Сверхэкспрессия белка SelK в клетках BGC-823 приводит к ингибированию их способности к миграции. Миграционная способность клеток BGC-823 после сверхэкспрессии в них полноразмерного белка SelK (группа клеток SelK), была существенно снижена по сравнению с клетками ct-SelK, Con2 и Con1 ($p < 0,01$), которые между собой демонстрировали примерно одинаковую способность к миграции (рис. 2, А и С). Несмотря на то, что воздействие полнораз-

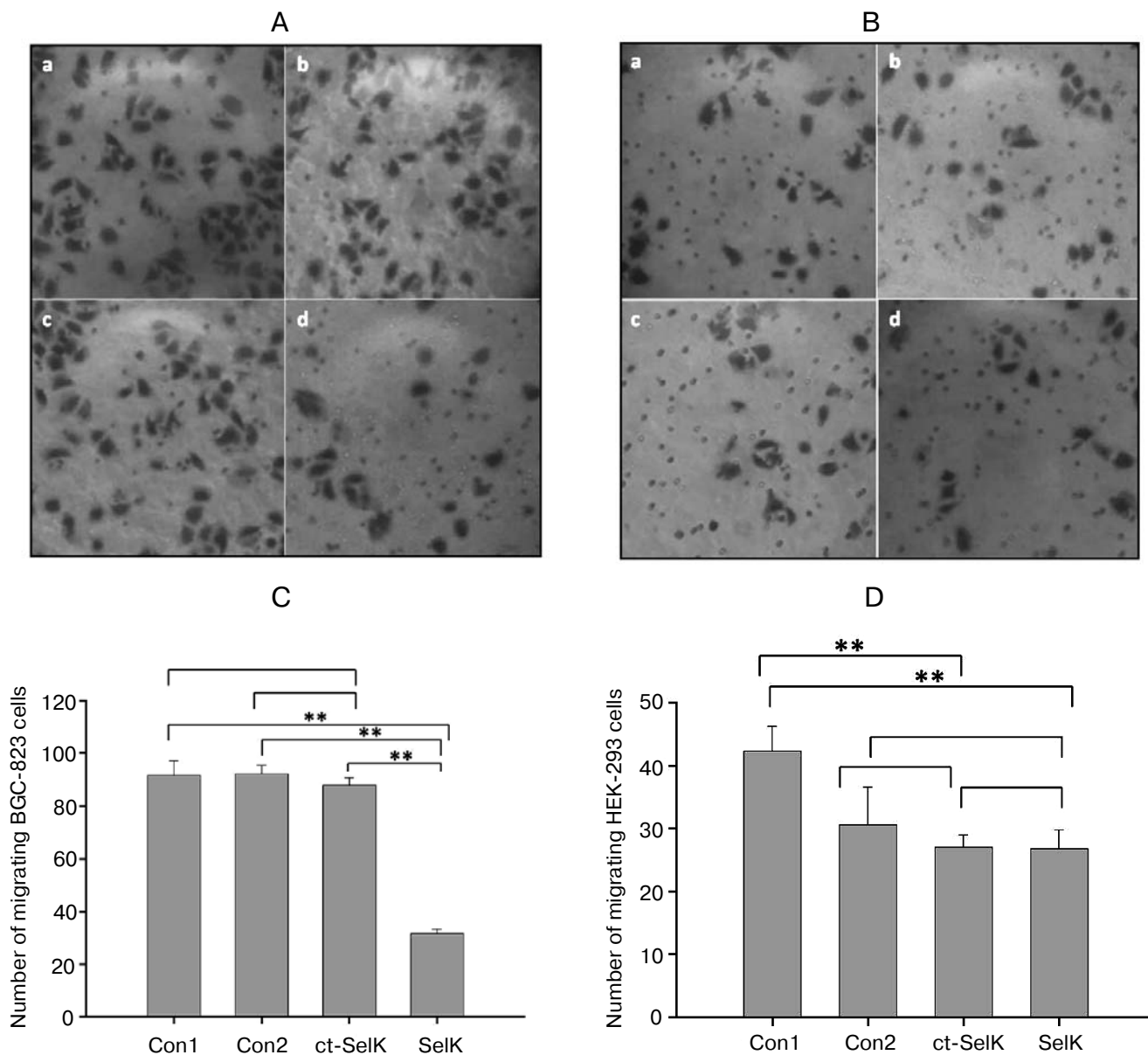


Рис. 2. Влияние сверхэкспрессии селенопротеина К на миграцию клеток BGC-823 и HEK-293. А – Изображения мигрировавших раковых клеток BGC-823 на нижней стороне мембраны: клетки SelK (d), ct-SelK (c), Con2 (b) и Con1 (a). Клетки подсчитывали с помощью флуоресцентного микроскопа при 400× увеличении; В – изображения мигрировавших эмбриональных клеток HEK-293, трансфицированных так же, как и клетки BGC-823; С и D – гистограммы, представляющие результаты подсчета количества мигрировавших клеток BGC-823 и HEK-293 соответственно. Все данные представлены как средние значения \pm s.d. по трем экспериментам; ** $p < 0,01$

мерного SelK на миграцию клеток BGC-823 было более существенным, чем на их адгезию (ср. рис. 1, А и 2, С), в обоих случаях активным был только полноразмерный белок, поскольку сверхэкспрессия его укороченной формы (ct-SelK) не оказывала заметного влияния на клеточную миграцию ($p > 0,05$).

Так же, как и в случае с адгезией на Матригле, миграционная способность эмбриональных клеток HEK-293 после сверхэкспрессии полноразмерного SelK была сравнима со способностью к миграции у клеток, экспрессирующих усеченную форму SelK (ct-SelK) или трансфицированных «пустой» плазмидой (Con2) ($p > 0,05$), но в отличие от случая с адгезией была значительно редуцирована по сравнению с нетрансфицированными клетками (Con1) ($p < 0,01$) (рис. 2, В и D).

Сверхэкспрессия белка SelK в клетках BGC-823 приводит к снижению их жизнеспособности. Как следует из рис. 3, А, жизнеспособность клеток BGC-823 значительно снижалась после сверхэкспрессии в них полноразмерного белка SelK ($p < 0,01$). В то же время сверхэкспрессия усеченного белка ct-SelK лишь немного изменяла жизнеспособность этих клеток по сравнению с контрольными клетками (Con1 и Con2) ($p > 0,05$). Жизнеспособность эмбриональных клеток HEK-293 после сверхэкспрессии SelK лишь незначительно отличалась от жизнеспособности клеток ct-SelK, Con2 и Con1 ($p > 0,05$) (рис. 3, В).

Сверхэкспрессия белка SelK в клетках BGC-823 приводит к индукции апоптоза. В отсутствие сверхэкспрессии белка SelK в клетках BGC-823 не наблюдалось никаких признаков апоптоза (рис. 4, А). Напротив, после сверхэкспрессии полноразмерного белка SelK (красная флуоресценция тега dsRed в экспрессирующем гибридном белке SelK) (рис. 4, В, а) клетки становились меньше, а их мембраны выпячивались в виде пузырьков и формировали отделяющиеся от клеточной поверхности везикулы (клетки демонстрируют зеленое флуоресцентное окрашивание в цитоплазме при тестировании на Ca^{2+} с красителем Fluo-3/AM). Кроме этого наблюдалось появление апоптотических телец в ближайшем окружении клеток (рис. 4, В, b). Ядра клеток (флуоресценция голубого цвета при окраске ДНК с помощью hoechst 33342) становились более плотными (рис. 4, В, c). С клетками HEK-293 после сверхэкспрессии SelK существенных изменений не происходило (ср. рис. 4, С и D).

Можно отметить, что уровень экспрессии полноразмерного белка SelK был во всех случаях немного ниже, чем у его усеченной с С-конца формы. Это объясняется тем, что белок SelK длиннее белка ct-SelK, а его экспрессия требует образования селеноцистеина в результате довольно сложного процесса.

Анализ методом проточной цитофлуорометрии показал, что степень апоптоза клеток BGC-823 при сверхэкспрессии в них белка SelK была зна-

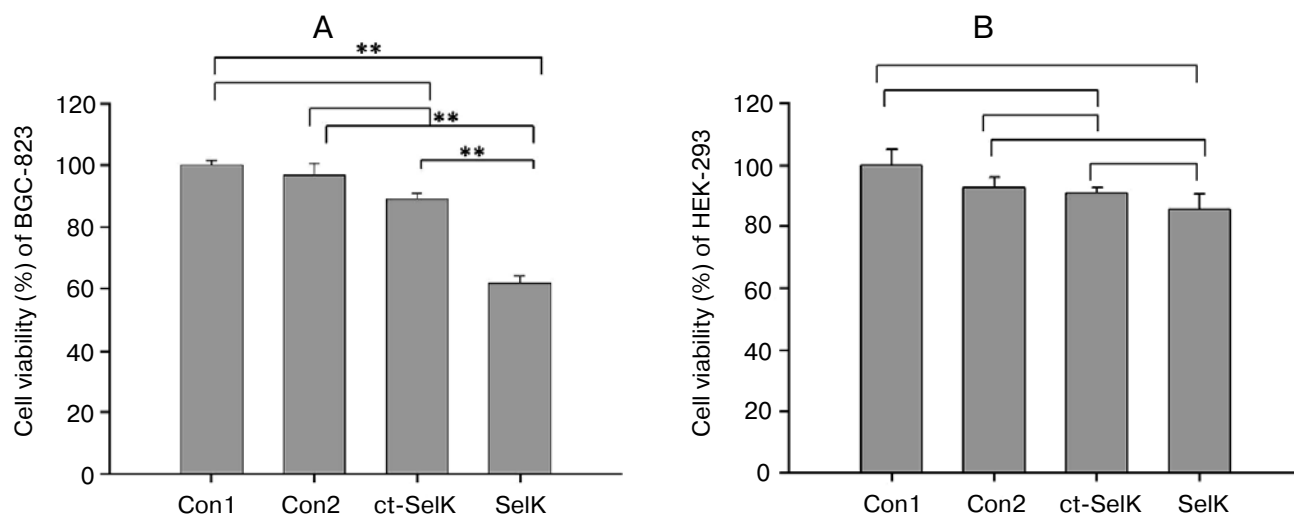


Рис. 3. Жизнеспособность клеток BGC-823 и HEK-293 при сверхэкспрессии в них селенопротеина K. А – Жизнеспособность культуры клеток BGC-823 при сверхэкспрессии полноразмерного селенопротеина K (SelK) или его усеченной формы (ct-SelK), а также культур нетрансфицированных клеток (Con1) или клеток, трансфицированных «пустой» плазмидой pDsRed2-N1 (Con2); В – жизнеспособность культур клеток HEK-293, трансфицированных, соответственно, теми же плазмидами, что и клетки BGC-823. Жизнеспособность клеток определяли в МТТ-тесте. Все данные представлены как средние значения \pm s.d. по трем экспериментам; ** $p < 0,01$

чительно более высокой, чем в клетках, экспрессирующих *ct-SelK* ($p < 0,01$), и более высокой, чем в этих же клетках при сверхэкспрессии «пустой» плазмиды (Con) ($p < 0,05$) (рис. 5, А и С). С другой стороны, степень апоптоза клеток НЕК-293 при сверхэкспрессии в них белка *SelK* была лишь незначительно выше, чем при сверх-

экспрессии *ct-SelK* или после их трансфекции «пустой» плазмидой (Con) (рис. 5, В и D).

Сверхэкспрессия *SelK* сопровождается увеличением уровня свободного кальция в цитозоле. Методом проточной цитофлуориметрии было показано, что уровень свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле клеток BGC-823 после сверхэкспрес-

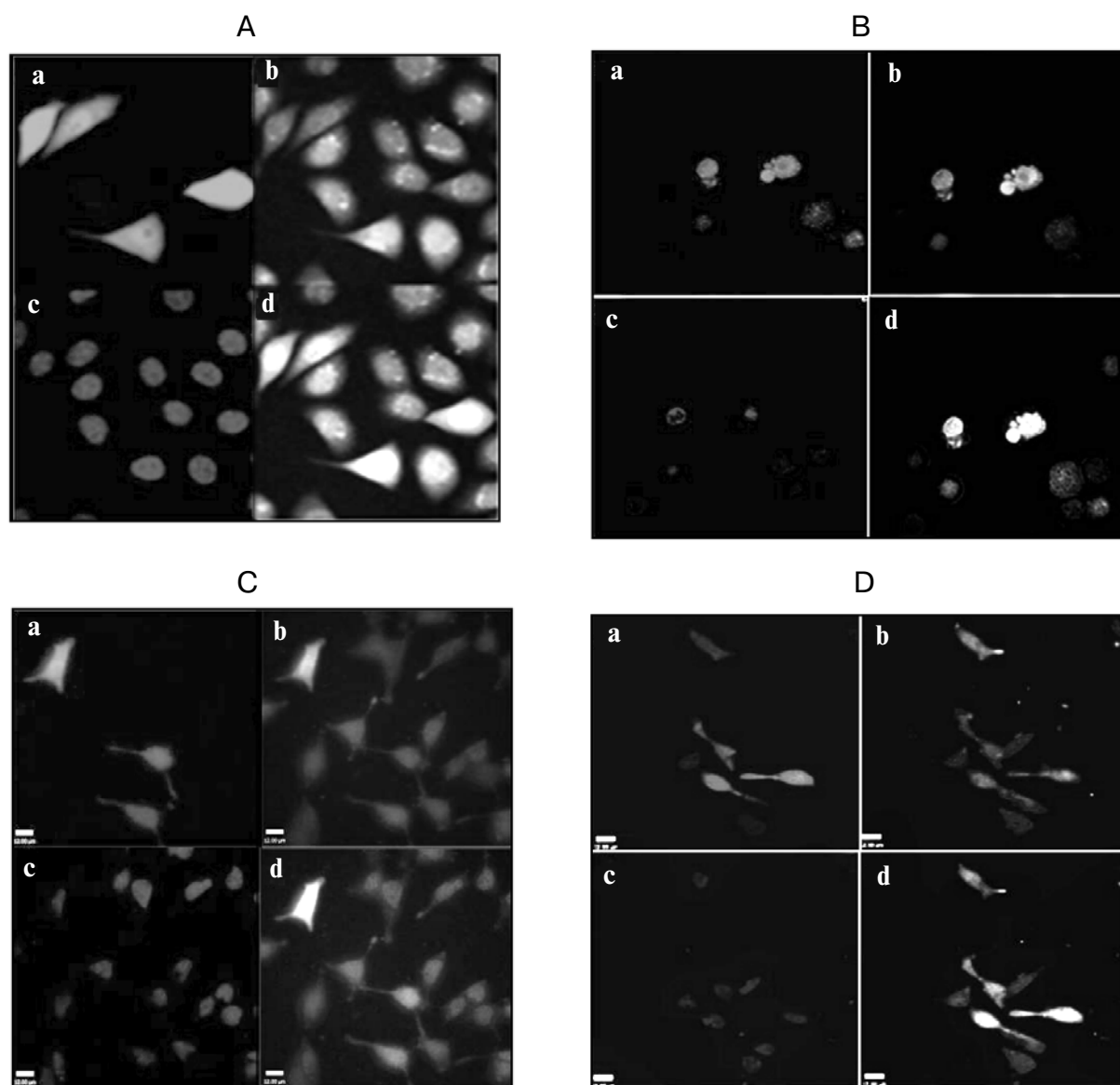


Рис. 4. Изучение методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии клеток BGC-823 и НЕК-293 после сверхэкспрессии в них селенопротеина К. А и С – Клетки BGC-823 и НЕК-293 соответственно, трансфицированные «пустой» плазмидой, экспрессирующей *dsRed*; В и D – клетки BGC-823 и НЕК-293 соответственно после сверхэкспрессии в них полноразмерного белка *SelK*, несущего *tag dsRed*; а – трансфицированные клетки, испускающие флуоресценцию красного цвета, обусловленную наличием гена красного флуоресцирующего белка в «пустой» плазмиде (А и С) или тега *dsRed* в экспрессированном гибридном белке *SelK* (В и D), были затем окрашены красителем *hoechst 33342*, что обусловило голубое свечение ядер этих клеток (с), и красителем *Fluo-3/AM*, придающим зеленое свечение цитоплазме и ЭР и позволяющим выявлять вариации в этих структурах (b); d – изображение, полученное при слиянии изображений а, b и с. Увеличение при лазерной конфокальной микроскопии составило 60×

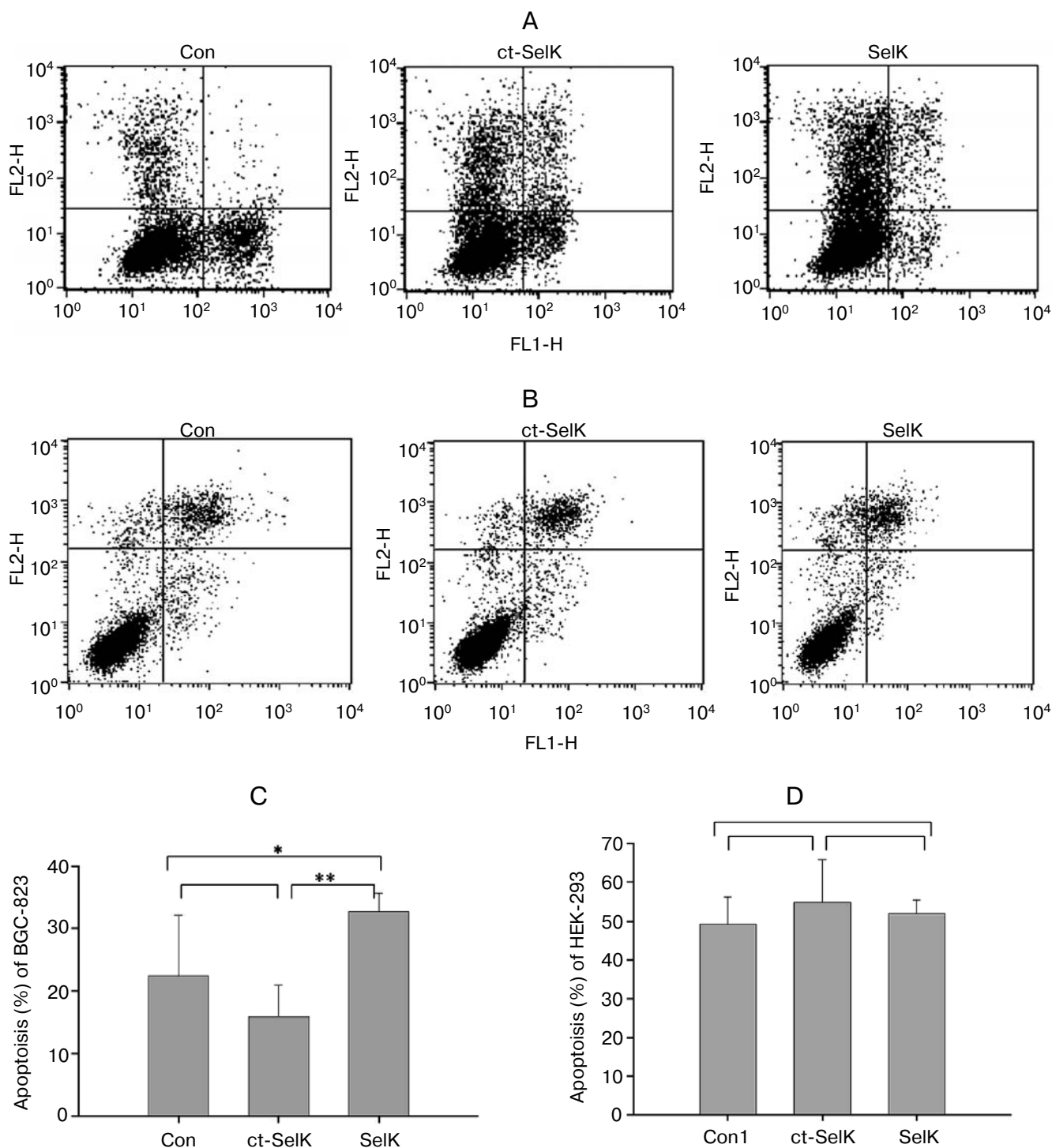


Рис. 5. Анализ методом проточной цитофлуориметрии апоптоза клеток BGC-823 и HEK-293 после сверхэкспрессии в них селенопротеина K. А и В – Дот-плоты для клеток BGC-823 и HEK-293 соответственно, трансфицированных «пустой» плазмидой, несущей ген красного флуоресцирующего белка (Con), или для тех же клеток после сверхэкспрессии белков ct-SelK или SelK, содержащих тер dsRed; С и D – гистограммы, представляющие результаты расчета степени апоптоза клеток BGC-823 и HEK-293 соответственно. Все данные представлены как средние значения \pm s.d. по трем экспериментам; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. После трансфекции клеток в течение 48 ч соответствующими плазмидами, несущими красный флуоресцирующий белок, они были окрашены ФИТЦ-аннексином V и проанализированы с помощью проточного цитофлуориметра. На дот-плотах: FL1-H – интенсивность зеленой флуоресценции ФИТЦ, FL2H – интенсивность красной флуоресценции тега dsRed. Было проанализировано по меньшей мере по 10 000 клеток из каждой группы. Для обчета полученных данных была использована программа Cell Quest

сии в них полноразмерного белка SelK был значительно выше, чем после сверхэкспрессии ct-SelK или в клетках, трансфицированных «пустой» плазмидой (Con) ($p < 0,01$). Напротив, после сверхэкспрессии усеченной формы ct-SelK существенной разницы по сравнению с контролем не наблюдалось ($p > 0,05$) (рис. 6, А). После сверхэкспрессии SelK в клетках HEK-293 уровень свободного Ca^{2+} в цитозоле был существенно выше, чем в клетках ct-SelK ($p < 0,05$) (рис. 6, В). Можно заметить, что все вариации уровней свободного кальция в трансфицированных клетках HEK-293 происходили не так, как вариации способностей этих клеток к адгезии и миграции или как изменения в жизнеспособности клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Метастазирование раковой опухоли — это многостадийный процесс, начинающийся с инвазии раковых клеток в соседние ткани. За этим, как правило, следует миграция клеток в кровоток путем их проникновения через слой эндотелия, перемещение вдоль кровяного русла и последующая миграция из сосуда и размножение в тканях различных органов. Конечной стадией является прорастание кровеносных сосудов во вновь образовавшуюся растущую раковую опухоль [22]. Адгезия на Матригеле и возможность к миграции являются важными характерными признаками способности раковых клеток к метастазированию. Было установлено, что некоторые селенопротеины тесно связаны с процессами метастазирования раковых опухолей. Нап-

пример, сверхэкспрессия селенсвязывающего протеина типа 1 (SBP1) в клетках линии HCT116 рака толстой кишки человека не только ингибирует клеточную пролиферацию и активирует апоптоз, но также снижает способность раковых клеток к миграции [23]. Другим примером является глутатионпероксидаза типа 2 (GPX2), которая стимулирует пролиферацию клеток HT29 аденокарциномы толстой кишки человека, но ингибирует их миграцию и инвазию *in vitro* [24]. Это ингибирующее воздействие GPX2 осуществляется, по-видимому, независимо от ее антиоксидантной активности. Известно также, что сверхэкспрессия GPX3 в клетках линий PC3 и DU145 рака простаты человека и клетках опухоли LNCaP приводит к значительной редукции их способности к инвазии *in vitro* [23].

Мы впервые установили, что сверхэкспрессия человеческого селенопротеина К в клетках линии BGC-823 рака человека ингибирует их способность к адгезии на Матригеле и к миграции *in vitro*, а следовательно, может приводить к снижению метастазирования этих трансфицированных клеток. Мы показали, что такими блокирующими свойствами обладал только полноразмерный белок SelK, тогда как его усеченная с С-конца форма (ct-SelK) меньше влияла на клеточную адгезию и, по-видимому, не влияла на миграцию трансфицированных клеток. Из проведенных нами экспериментов следовало, что уровень экспрессии полноразмерного SelK был всегда немного ниже, чем у белка ct-SelK, поскольку первый имел большие размеры, а для его экспрессии требовался селеноцистеин, образующийся в результате сложного про-

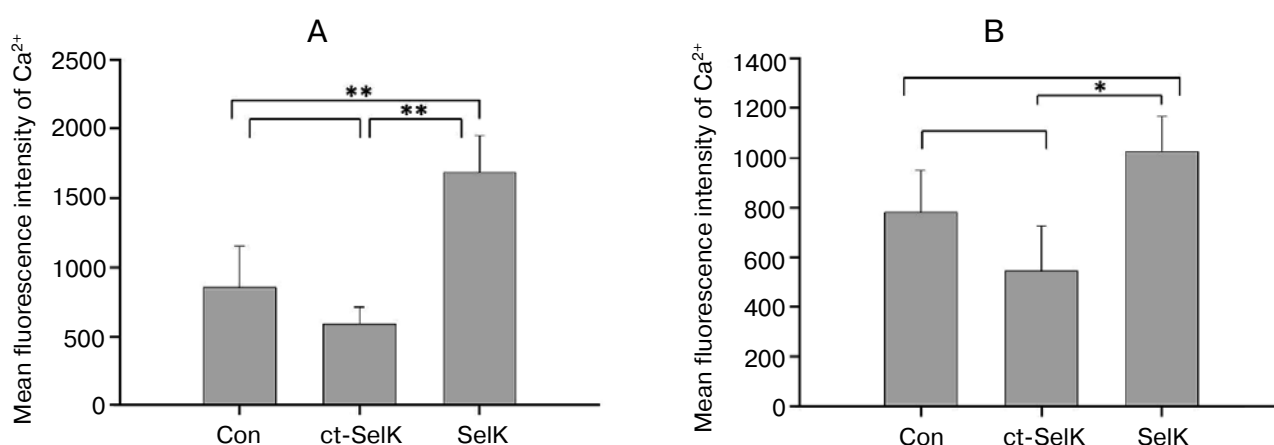


Рис. 6. Влияние селенопротеина К на уровень свободного кальция в цитозоле клеток BGC-823 (А) и HEK-293 (В). Раковые и эмбриональные клетки, трансфицированные соответствующими плазмидами и экспрессирующие полноразмерный (SelK) или усеченный с С-конца (ct-SelK) селенопротеин К или же «пустую» плазмиду (Con), были окрашены красителем Fluo-3/AM. Все данные представлены как средние значения \pm s.d. по трем независимым экспериментам; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

цесса. Поэтому является маловероятным, что все упомянутые выше функциональные различия между полноразмерной и усеченной формами селенопротеина K были связаны с различиями в уровнях их экспрессии.

Ингибирование метастазирования раковых клеток часто связывают с нарушением их пролиферации или с апоптозом, поэтому мы изучали влияние сверхэкспрессии SelK на апоптоз трансфицированных клеток. Мы установили, что сверхэкспрессия полноразмерного белка SelK в клетках BGC-823 индуцировала их апоптоз, что, по-видимому, снижало и их жизнеспособность. Поскольку все эти эффекты наблюдались только при сверхэкспрессии полноразмерной формы SelK и отсутствовали при сверхэкспрессии усеченной формы ct-SelK, то маловероятно, что все они являлись просто следствием токсического воздействия на клетки сверхэкспрессии экзогенных генов.

В своих предыдущих работах мы показали, что селенопротеин dSelK может влиять на гомеостаз кальция в клетках S2 у *Drosophila* [18]. Ионы Ca^{2+} функционируют в клетке в качестве вторичного мессенджера. Они принимают участие в регуляции многих физиологических процессов, протекающих в различных клетках и тканях [25, 26]. Главным резервуаром кальция в клетке является ЭР. Поступление кальция в ЭР или его выброс в цитоплазму жестко контролируются и осуществляются через три канала, расположенные в мембранах ЭР: рианодиновый рецептор (RyR), рецептор к инозитол-1,4,5-трифосфату (IP3R) и Ca^{2+} АТРаза саркоплазматического/эндоплазматического ретикулума (SERCA). Жалей с соавт. [27] в 1999 г. обнаружили, что при посредстве IP3R может осуществляться критическая потеря эндоплазматическим ретикуломом ионов Ca^{2+} и индукция зависящего от митохондрий апоптоза. С тех пор подобные наблюдения были сделаны разными авторами и для других систем индукции апоптоза [28–34]. Таким образом, было установлено, что нарушение кальциевого гомеостаза может являться ключевым фактором, приводящим к апоптозу. Для установления наиболее вероятного механизма, лежащего в основе индукции апоптоза клеток BGC-823 после сверхэкспрессии в них SelK, мы изучали влияние этого белка на гомеостаз Ca^{2+} в трансфицированных клетках. Мы показали, что после экспрессии SelK в клетках BGC-823 повы-

шался уровень свободного кальция в цитозоле, в то время как сверхэкспрессия усеченной формы ct-SelK в этих клетках такого воздействия на уровень Ca^{2+} не оказывала. Таким образом, увеличение уровня свободного кальция в цитозоле может являться первопричиной, лежащей в основе механизма, по которому белок SelK индуцирует апоптоз, снижает способность клеток к адгезии на Матригеле и эффективно ингибирует миграцию раковых клеток. Полученные нами результаты не противоречат представленным ранее данным о том, что подавление экспрессии SelK в клетках HepG2 приводит к их апоптозу, индуцированному агентами ЭР-стресса [17]. Действительно, белок SelK является важным резидентным компонентом ЭР, поэтому при его избытке или недостатке возникает ЭР-стресс, что, в конечном счете, приводит к индукции апоптоза в раковых клетках.

Сверхэкспрессия человеческого селенопротеина K в раковых клетках человека линии BGC-823 служит причиной повышения концентрации свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле этих клеток и, в свою очередь, приводит к подавлению их роста и индукции апоптоза. Одновременно происходит ингибирование адгезивной и миграционной способностей раковых клеток, что критически сказывается на их метастазировании. Все эти воздействия на раковые клетки оказывает только полноразмерный белок SelK. Хотя наблюдаемое нами повышение концентрации свободного кальция в цитозоле выбранных в качестве контрольных человека HEK-293 после сверхэкспрессии в них рекомбинантного белка SelK было более высоким, чем после сверхэкспрессии ct-SelK или после трансфекции «пустой» плазмидой, но это повышение не приводило ни к апоптозу, ни к существенному ингибированию клеточной адгезии или способности этих клеток к миграции. По-видимому, эмбриональные клетки были более устойчивы к изменению уровня кальция в цитозоле, чем раковые.

Работа выполнена при финансовой поддержке Национального фонда естественных наук Китая (грант 31371085), Фонда образования департамента провинции Ляонинг Китая (грант L2013010) и Фонда проекта № 211 университета провинции Ляонинг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kyriakopoulos, A., and Behne, D. (2002) Selenium-containing proteins in mammals and other forms of life, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **145**, 1–46.
- Behne, D., and Kyriakopoulos, A. (2001) Mammalian selenium-containing proteins, *Annu. Rev. Nutr.*, **21**, 453–473.
- Labunsky, V.M., Hatfield, D.L., and Gladyshev, V.N. (2014) Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles, *Physiol. Rev.*, **94**, 739–777.
- Hatfield, D.L., and Gladyshev, V.N. (2002) How selenium has altered our understanding of the genetic code, *Mol. Cell Biol.*, **22**, 3565–3576.
- Rayman, M.P. (2000) The importance of selenium to human health, *Lancet*, **356**, 233–241.
- Behne, D., Weiler, H., and Kyriakopoulos, A. (1996) Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats, *J. Reprod. Fertil.*, **106**, 291–297.
- Stadtman, T.C. (1996) Selenocysteine, *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 83–100.
- Kryukov, G.V., Castellano, S., and Novoselov, S.V. (2003) Characterization of mammalian selenoproteomes, *Science*, **300**, 1439–1443.
- Rayman, M.P. (2005) Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action, *Proc. Nutr. Soc.*, **64**, 527–542.
- Boosalis, M.G. (2008) The role of selenium in chronic disease, *Nutr. Clin. Pract.*, **23**, 152–160.
- Jin, J.S., Baek, S., Lee, H., Oh, M.Y., Koo, Y.E., Shim, M.S., Kwon, S.Y., Jeon, I., Park, S.Y., Baek, K., Yoo, M.A., Hatfield, D.L., and Lee, B.J. (2004) A DNA replication-related element downstream from the initiation site of *Drosophila* selenophosphate synthetase 2 gene is essential for its transcription, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 2482–2493.
- Shchedrina, V.A., Zhang, Y., Labunsky, V.M., Hatfield, D.L., and Gladyshev, V.N. (2010) Structure-function relations, physiological roles, and evolution of mammalian ER-resident selenoproteins, *Antioxid. Redox Signal.*, **12**, 839–849.
- Chen, C.L., Shim, M.S., Chung, J., Yoo, H.S., Ha, J.M., Kim, J.Y., Choi, J., Zang, S.L., Hou, X., Carlson, B.A., Hatfield, D.L., and Lee, B.J. (2006) G-rich, a *Drosophila* selenoprotein, is a Golgi-resident type III membrane protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **348**, 1296–1301.
- Lu, C., Qiu, F., Zhou, H., Peng, Y., Hao, W., Xu, J., Yuan, J., Wang, S., Qiang, B., Xu, C., and Peng, X. (2006) Identification and characterization of selenoprotein K: an antioxidant in cardiomyocytes, *FEBS Lett.*, **580**, 5189–5197.
- Verma, S., Hoffmann, F.W., Kumar, M., Huang, Z., Roe, K., Nguyen-Wu, E., Hashimoto, A.S., and Hoffmann, P.R. (2011) Selenoprotein K knockout mice exhibit deficient calcium flux in immune cells and impaired immune responses, *J. Immunol.*, **186**, 2127–2137.
- Shchedrina, V.A., Everley, R.A., Zhang, Y., Gygi, S.P., Hatfield, D.L., and Gladyshev, V.N. (2011) Selenoprotein K binds multiprotein complexes and is involved in the regulation of endoplasmic reticulum homeostasis, *J. Biol. Chem.*, **286**, 42937–42948.
- Du, S., Zhou, J., Jia, Y., and Huang, K. (2010) SelK is a novel ER stress-regulated protein and protects HepG2 cells from ER stress agent-induced apoptosis, *Arch. Biochem. Biophys.*, **502**, 137–143.
- Ben, S.B., Wang, Q.Y., Xia, L., Xia, J.Z., Cui, J., Wang, J., Yang, F., Bai, H., Shim, M.S., Lee, B.J., Sun, L.G., and Chen, C.L. (2011) Selenoprotein dSelK in *Drosophila* elevates release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum by upregulating expression of inositol 1,4,5-Tris-phosphate receptor, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 1030–1036.
- Sladowski, D., Steer, S.J., Clothier, R.H., and Balls, M. (1993) An improved MTT assay, *J. Immunol. Methods*, **157**, 203–207.
- Jin, S., Zhang, Q.Y., Kang, X.M., Wang, J.X., and Zhao, W.H. (2010) Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway, *Ann. Oncol.*, **21**, 263–268.
- Schepers, E., Glorieux, G., Dhondt, A., Leybaert, L., and Vanholder, R. (2009) Flow cytometric calcium flux assay: evaluation of cytoplasmic calcium kinetics in whole blood leukocytes, *J. Immunol. Methods*, **348**, 74–82.
- van Zijl, F., Krupitza, G., and Mikulits, W. (2011) Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration, *Mutat. Res.*, **728**, 23–34.
- Pohl, N.M., Tong, C., Fang, W., Bi, X., Li, T., and Yang, W. (2009) Transcriptional regulation and biological functions of selenium-binding protein 1 in colorectal cancer *in vitro* and in nude mouse xenografts, *PLoS One*, **4**, e7774.
- Banning, A., Kipp, A., Schmitmeier, S., Lowinger, M., Florian, S., Krehl, S., Thalmann, S., Thierbach, R., Steinberg, P., and Brigelius-Flohe, R. (2008) Glutathione peroxidase 2 inhibits cyclooxygenase-2-mediated migration and invasion of HT-29 adenocarcinoma cells but supports their growth as tumors in nude mice, *Cancer Res.*, **68**, 9746–9753.
- Yu, Y.P., Yu, G., Tseng, G., Cieply, K., Nelson, J., Defrances, M., Zarnegar, R., Michalopoulos, G., and Luo, J.H. (2007) Glutathione peroxidase 3, deleted or methylated in prostate cancer, suppresses prostate cancer growth and metastasis, *Cancer Res.*, **67**, 8043–8050.
- Lipskaia, L., Hulot, J.S., and Lompre, A.M. (2009) Role of sarco/endoplasmic reticulum calcium content and calcium ATPase activity in the control of cell growth and proliferation, *Pflügers Arch.*, **457**, 673–685.
- Brini, M., and Carafoli, E. (2009) Calcium pumps in health and disease, *Physiol. Rev.*, **89**, 1341–1378.
- Szalai, G., Krishnamurthy, R., and Hajnoczky, G. (1999) Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals, *EMBO J.*, **18**, 6349–6361.
- Szondy, Z. (1994) Adenosine stimulates DNA fragmentation in human thymocytes by Ca(2+)-mediated mechanisms, *Biochem. J.*, **304**, 877–885.
- Kobayashi, N., Hiromatsu, K., Matsuzaki, G., Harada, M., Matsumoto, Y., Nomoto, K., and Yoshikai, Y. (1997) A sustained increase of cytosolic Ca²⁺ in gammadelta T cells triggered by co-stimulation via TCR/CD3 and LFA-1, *Cell Calcium*, **22**, 421–430.
- Kimura, C., Zhao, Q.L., Kondo, T., Amatsu, M., and Fujiwara, Y. (1998) Mechanism of UV-induced apoptosis in human leukemia cells: roles of Ca²⁺/Mg²⁺-dependent endonuclease, caspase-3, and stress-activated protein kinases, *Exp. Cell Res.*, **239**, 411–422.
- Nishihara, H., Kizaka-Kondoh, S., Insel, P.A., and Eckmann, L. (2003) Inhibition of apoptosis in normal and transformed intestinal epithelial cells by cAMP through induction of inhibitor of apoptosis protein (IAP)-2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 8921–8926.
- Stupack, D.G., and Cheresch, D.A. (2002) Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival, *J. Cell Sci.*, **115**, 3729–3738.
- Hu, H., O'Mullane, L.M., Cummins, M.M., Campbell, C.R., Hosoda, Y., Poronnik, P., Dinudom, A., and Cook, D.I. (2010) Negative regulation of Ca(2+) influx during P2Y(2) purinergic receptor activation is mediated by Gβγ-subunits, *Cell Calcium*, **47**, 55–64.

**OVEREXPRESSION OF SELENOPROTEIN
SelK IN BGC-823 CELLS INHIBITS CELL
ADHESION AND MIGRATION**

**S. B. Ben^{1,3}, B. Peng¹, G. C. Wang¹, C. Li²,
H. F. Gu¹, H. Jiang³, X. L. Meng², B. J. Lee⁴,
C. L. Chen^{2*}**

¹ Liaoning University, School of Life Science, Shenyang
110036, China; E-mail: bensongbin007@163.com

² Liaoning University, School of Pharmaceutical Science,
Shenyang 110036, China; E-mail: chenchanglanbio@aliyun.com

³ Departments of Pediatrics and Medicine, University of Colorado
School of Medicine, Aurora, CO, USA; E-mail: hua.jiang@ucdener.edu

⁴ Seoul National University, Institute of Molecular Biology and Genetics,
School of Biological Sciences, Laboratory of Molecular Genetics
and Genomics, Seoul 151-742, Korea; E-mail: imbgimg@plaza.snu.ac.kr

Received March 16, 2015

Revision received June 7, 2015

In this study, effects of human selenoprotein SelK on the adhesion and migration ability of human gastric cancer BGC-823 cells were investigated using Matrigel adhesion and transwell migration assays, respectively. The Matrigel adhesion ability of BGC-823 cells that overexpressed SelK declined very significantly ($p < 0.01$) compared with that of cells not expressing the protein. The migration ability of BGC-823 cells that overexpressed SelK also declined very significantly ($p < 0.01$). On the other hand, the Matrigel adhesion ability and the migration ability of the cells that overexpressed C-terminally truncated SelK did not decline significantly. Also, the Matrigel adhesion ability and the migration ability of human embryonic kidney HEK-293 cells that overexpressed SelK did not express significant change ($p > 0.05$) with the cells that overexpressed the C-terminally truncated protein. In addition to the effect on Matrigel adhesion and migration, the overexpression of SelK also caused a loss of cell viability (as measured by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay) and induced apoptosis as shown by confocal microscopy and flow cytometry. The cytosolic free Ca^{2+} level of these cells was significantly increased as detected by flow cytometry. But the overexpression of SelK in HEK-293 cells did not cause a significant loss of cell viability or induce apoptosis. Only the elevation of cytosolic free Ca^{2+} level in these cells was significant. Taken together, the results suggested that SelK could inhibit Matrigel adhesion and migration, loss of viability, and induction of apoptosis of human cancer cells, resulting from the release of intracellular Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum being one of the mechanisms whereby the protein exerted its impact. Furthermore, only the full-length protein was capable of producing such impact since the C-terminally truncated form appeared to have no impact. Embryonic cells were not influenced by the elevation of free Ca^{2+} level in cytosol, probably due to their much greater tolerance to the variation.

Key words: selenoprotein, SelK, cancer cells, adhesion, migration, calcium homeostasis