

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА КЛЕТОЧНЫХ ТУБУЛИНОВ НА РОСТОВЫЕ И АДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА ЧЕЛОВЕКА

А.С. Портянко, А.Б. Межеевский, С.Т. Акалович, Н.В. Гончарова, Т.М. Дорошенко

Белорусский государственный медицинский университет;

Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий

Колоректальный рак (КРР) относится к наиболее распространенным злокачественным опухолям человека. В Республике Беларусь КРР занимает третье место как причина онкологической смертности [1]. Отдаленные результаты лечения страдающих колоректальным раком напрямую зависят от ряда факторов, включающих стадию заболевания, степень дифференцировки опухоли, ее метастатический потенциал, формирующуюся устойчивость к противоопухолевым средствам и других. Одним из подходов в лечении является использование химиотерапевтических средств, блокирующих митотическое веретено и подавляющих деление клеток. Их молекулой-мишенью является β -тубулин — составной компонент микротрубочек, структур, необходимых для клеточного деления, внутриклеточного транспорта, поддержания формы клетки и ее тургора. Известно семь изоформ β -тубулина, представленных в различных клетках и тканях человека, причем в опухолевых тканях спектр экспрессируемых тубулинов может значительно меняться [2]. Широко изучается диагностическая и прогностическая роль экспрессии изоформ β -тубулина при различных видах рака, и наибольшее число данных накоплено по β III-тубулину как фактору прогноза ответа на терапию и выживаемости. В частности, показана связь экспрессии β III-тубулина с плохим прогнозом при раке яичников, мелкоклеточном раке легкого, раке простаты и некоторых других [3]. В настоящее время β III-тубулин рассматривается как регулятор сигнальных анти-апоптотических путей, наделяющих клетку способностью противостоять апоптозу — специфическому типу апоптоза, вызванному нарушенной адгезией эпителиальных клеток к межклеточному матриксу [3]. Тем не менее до сих пор неизвестно, как именно изменяет β III-тубулин адаптивные свойства опухолевых клеток и по каким механизмам.

Ранее нами было установлено повышение экспрессии β III-тубулина в большинстве случаев КРР [4], что поднимает вопрос о возможной роли этого изоформа тубулина в прогрессии данного вида рака.

Цель работы — установление роли β III-тубулина в жизнеспособности, ростовых и адгезивных свойствах опухолевых клеток колоректального рака.

Материал и методы. Исследование было проведено на клеточных линиях КРР человека HT-29 и HCT116, в которых нами ранее была обнаружена экспрессия β III-тубулина.

Клетки культивировали в полной среде IMDM (HyClone), содержащей пенициллин и стрептомицин в концентрации 100 ед/мл и 100 мкг/мл, а также 10% эмбриональной телячьей сыворотки в культуральных флаконах в атмосфере, содержащей 5% CO₂, при температуре +37°C. Для снятия клеток с подложки клеточную культуру трипсинизировали (0,25% трипсина и 5 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты) при 37°C 2–3 мин. Подсчет клеток производили в камере Горяева при помощи окрашивания трипановым синим.

Приготовление стекол для морфологического исследования и окраска. Стерильные покровные стекла помещали в стерильные пластиковые чашки Петри, после чего вносили суспензию клеток в полной питатель-

ной среде IMDM в концентрации 30000/мл. После 2–3 дней инкубации и достижения клетками около 70% монослоя, стекла фиксировали в ацетоне-метаноле. После двукратной отмывки стекол в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), стекла помещали в ледяной (-200°C) метанол на 5 мин, после чего переносили на 2 мин в ледяной ацетон. После высушивания при комнатной температуре стекла хранили в морозильной камере до проведения окраски гематоксилином и эозином.

Трансфекция и РНК-интерференция. Состояние РНК-интерференции в клеточных линиях получали путем трансфекции в клетки малых интерферирующих РНК (siRNA), представляющих собой смесь из 4 последовательностей специфичных к разным участкам гена β_{III} -тубулина (siGENOMESMARTpool TUBB3, Dharmascon, ThermoScientific). В качестве контроля использовали нецелевую siRNA, не имеющую гомологии ни к одному известному гену в последовательности ДНК человека (**non-target siRNA**). **Трансфекцию осуществляли** согласно рекомендациям производителя. Клетки НТ-29 и НСТ116 накануне рассеивали в концентрации 50000/мл полной среды без антибиотиков. Через 20–24 ч проводили трансфекцию 50 нМ siRNA. Через 72 ч клетки отмывали, снимали с подложки трипсинизацией для последующих тестов.

Электрофорез и вестерн-блоттинг. Клетки лизировали буфером RIPA, инкубируя 20 мин на льду, центрифугировали на максимальной скорости (13000 об./мин) при 0°C . Надосадочную часть подвергали электрофоретическому разделению в вертикальных пластинах полиакриламидного геля (12,5%) в денатурирующих условиях с додецилсульфатом натрия согласно методике Лэмли [5]. Для проведения иммуноблоттинга белковые фракции после электрофореза переносили с помощью электроослюции из геля на нитроцеллюлозные мембраны Hybond C (Pharmacia). Мембраны инкубировали с соответствующими моноклональными антителами к β_{III} -тубулину (Promega), β_{I} -тубулину (Sigma) или β -актину (Sigma) в течение 18 ч на холоде, затем отмывали и инкубировали с системой визуализации EnVision (DAKO) и проявляли с помощью хромогена диаминобензидин (BioGenex). Мембраны после окраски анализировали на KodakImageStation 2000R. Денситометрическое измерение результатов вестерн-блоттинга проводилось с использованием программного пакета ImageJ 1.47v (NIH, USA).

Оценка ростовых свойств клеток. После трансфекции клетки растили 48 ч в 6-луночной культуральной плате, затем культуру трипсинизировали, число живых клеток подсчитывали в камере Горяева трижды для каждой культуры. В качестве контроля использовали интактную аналогичную культуру. Ростовую активность выражали в процентах по отношению к контрольной культуре.

Оценка клеточного цикла, апоптотических и некротических процессов. Для анализа распределения клеток по фазам клеточного цикла проводили окраску предварительно фиксированных в 70% ледяном этаноле клеток с пропидием иодидом, как описано ранее [6]. Окраску клеток для оценки апоптоза проводили с использованием ANNEXIN V-FITC /7-AAD KIT (BeckmanCoulter), следуя инструкции производителя. В анализ брали 1 млн клеток на точку, все культуры окрашивались в дуплете. Учет результатов проводили на проточном цитофлуориметре Becton Dickinson FACScan.

Оценка адгезивных свойств клеток. Клетки рассеивали в культуральной среде IMDM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, в плотности 15×10^4 клеток/лунку 24-луночной платы, предварительно покрытой коллагеном I типа (Gibco) в концентрации 50 мкг/мл. После 1 часа культивирования при $+37^{\circ}\text{C}$ среду с неадгезированными клетками удаляли. Подсчет неадгезированных клеток проводили с трипановым синим.

Статистический анализ. Статистический анализ результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 10.0 (StatSoft., Inc.).

Результаты и их обсуждение. Чтобы оценить вклад β_{III} -тубулина, перспективного фактора прогноза при различных видах рака, в ростовые свойства клеток КРР человека, мы провели эксперименты с транзиторным «выключением» данного изоформа тубулина. Для этого в клетки линий НСТ116 и НТ-29 вводилась siRNA, вызывающая селективную транзиторную супрессию трансляции гена β_{III} -тубулина (TUBB3). Степень подавления синтеза β_{III} -тубулина контролировали в вестерн-блоттинге лизатов клеток спустя 72 ч после трансфекции. Результаты представлены на рисунке 1.

Было достигнуто снижение экспрессии β_{III} -тубулина в 2,7 раза для НТ-29 и в 1,7 раз для НСТ116, при этом уровень экспрессии β_{I} -тубулина, основной формы тубулина, необходимой для поддержания нормального функционирования клетки, значительно не изменялся.

При этом отмечались значительные изменения в плотности культур. Через 72 ч после трансфекции плотность культуры клеток НТ-29 составила $101,7 \pm 12,8\%$ для нецелевой siRNA и $58,5 \pm 13,8\%$ для TUBB3 siRNA (от плотности контрольной интактной культуры), что подтверждалось и морфологическими исследованиями (рисунок 2). Для клеток НСТ116 аналогичные показатели составили $85,0 \pm 21,7$ и $34,8 \pm 16,6\%$.

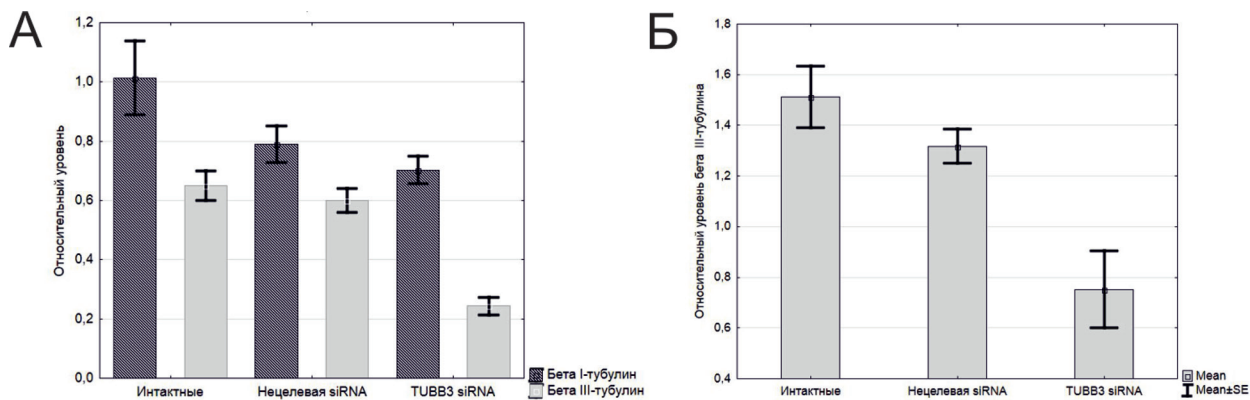


Рисунок 1 — Результаты денситометрических измерений иммунореактивности к изотипам β -тубулина, нормализованной по β -актину, в лизатах клеток линий HT-29 (А) и HCT116 (Б) через 72 ч после трансфекции. Результаты представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего в трех измерениях

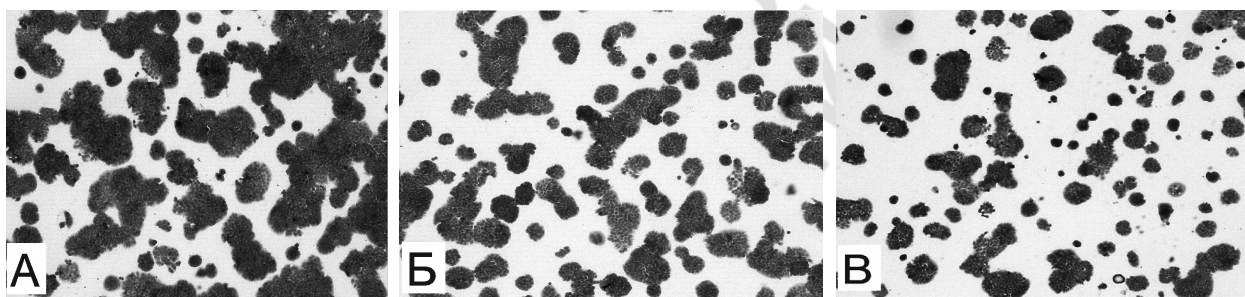


Рисунок 2 — Культура HT-29 через 72 ч после трансфекции: А — интактный контроль, Б — нецелевая siRNA, В — TUBB3 siRNA. Окраска гематоксилином и эозином. Объектив $\times 5$

Мы решили изучить, по какому механизму происходит снижение плотности культуры клеток колоректального рака после «выключения» гена β III-тубулина.

Для ответа на вопрос о жизнеспособности клеток с «выключенной» экспрессией β III-тубулина клетки были окрашены аннексином V и 7-амино-актиномицином-Д (7ААД), маркерами апоптоза и некроза. Трансфекция TUBB3 siRNA не привела к увеличению количества погибших или апоптозирующих клеток (не показано).

Мы также проанализировали распределение клеток линии HCT116 с подавленной экспрессией β III-тубулина по фазам клеточного цикла (рисунок 3).

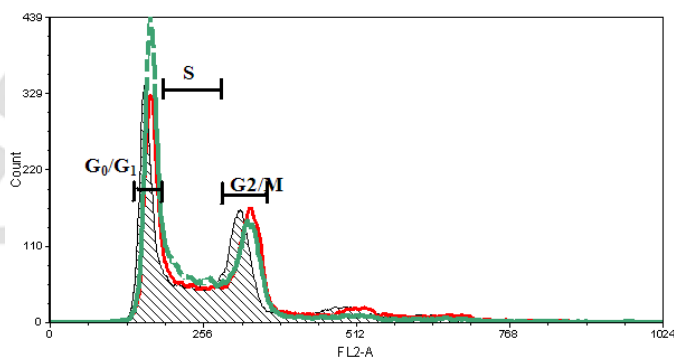


Рисунок 3 — Распределение клеток линии HCT116 по фазам клеточного цикла через 72 ч после трансфекции. Штриховка — интактный контроль, сплошная за жиренная — нецелевая siRNA, прерывистая за жиренная — TUBB3 siRNA

Как видно из представленных данных, клетки после трансфекции TUBB3 siRNA и non-target siRNA характеризовались одинаковым распределением по фазам клеточного цикла, сходным с таковым для интактного контроля. Как в клетках HT-29, так и HCT116, не было выявлено увеличения количества апоптотических либо некротизировавших клеток, что свидетельствует о том, что уменьшение клеток в культуре после трансфекции происходит по иным механизмам. В частности, возможно снижение адгезивных свойств клеток и их «detachment» с пластиковой подложки в суспензию.

Для проверки такой возможности мы изучили адгезивные свойства клеток после трансфекции siRNA в анализе с использованием покрытых коллагеном чашек Петри. На рисунке 4 представлены результаты подсчета неадгезированных клеток.

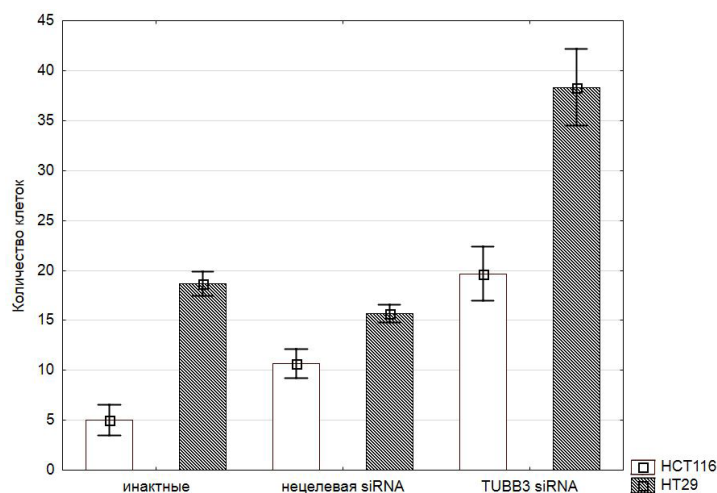


Рисунок 4 — Результаты измерения адгезивных свойств клеток линий HT-29 и HCT116 через 72 ч после трансфекции. Представлено количество клеток в суспензии спустя 2 ч инкубации в покрытых коллагеном чашках Петри

Видно, что после трансфекции TUBB3 siRNA число клеток в растворе увеличилось в два раза по сравнению с контролями, таким образом, в культурах обеих исследованных клеточных линий — HT-29 и HCT116 происходило снижение адгезивности после введения siRNA β -тубулина, но не контрольной non-target siRNA.

Полученные данные свидетельствуют о важной роли β -тубулина в ростовых свойствах опухолевых клеток, при этом экспрессия β -тубулина не влияет на их жизнеспособность и распределение по фазам клеточного цикла в стандартных культуральных условиях. Возможным механизмом уменьшения плотности их культур *in vitro* может быть снятие с подложки за счет снижения адгезивности и нарушенных межклеточных контактов и вхождения в апоптоз, специфический тип апоптоза, вызванный нарушенной адгезией эпителиальных клеток к межклеточному матриксу.

Заключение. β -тубулин вовлечен в процесс адгезии клеток КРП человека к молекулам межклеточного матрикса, что может свидетельствовать о важном вкладе β -тубулина в события, тесно связанные с нарушенной адгезией, такие как опухолевая трансформация, эпителиально-мезенхимальная транзигция, метастазирование и опухолевая прогрессия КРП. Возможным механизмом снижения плотности культуры клеток КРП после подавления экспрессии β -тубулина является нарушение их адгезивных свойств, и не связано с процессами апоптоза, некроза или прохождением фаз клеточного цикла.

TUBULIN ISOTYPES ROLE IN GROWTH AND ADHESIVE PROPERTIES OF COLORECTAL CANCER CELL

A.S. Portyanko, A.B. Mezheyeuski, S.T. Akalovich, N.V. Goncharova, T.M. Doroshenko

The influence of tubulin isotypes on the growth and adhesive characteristics of colorectal cancer cells HT-29 and HCT116 was studied. It was found that the change of tubulin microtubules reduces the adhesion of tumor cells to collagen and slows growth of tumor cells *in vitro* without affecting their viability. This data argue in favor of the important role of β -tubulin in the process connected to adherent-independent cell growth like epithelial-mesenchymal transition, cancer progression and metastatic colonization.

Keywords: colorectal cancer, tubulin microtubules, adhesion, growth.

Літэратура

1. Кохнюк, В.Т. Распространенность, диагностика и результаты лечения колоректального рака у жителей Беларуси / В.Т. Кохнюк // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. — 2013. — № 2. — С. 118–123.
2. Luduena, R.F. The role of microtubules in cell biology, neurobiology, and oncology / R.F. Luduena, A. Banerjee; ed. by T. Fojo. — N.Y.: Humana Press, 2008. — P. 123–175.
3. β_{III} -Tubulin: biomarker of taxane resistance or drug target? / R. Karki [et al.] // Expert. Opin. Ther. Targets. — 2013. — Vol. 17, № 4. — P. 461–472.
4. Portyanko, A. β_{III} -tubulin at the invasive margin of colorectal cancer: possible link to invasion / A. Portyanko, P. Kovalev, J. Gorgun // Virchows Arch. — 2009. — Vol. 454, № 5. — P. 541–548.
5. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680–685.
6. Wogonin induced G1 cell cycle arrest by regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway and inactivating CDK8 in human colorectal cancer carcinoma cells / L. He [et al.] // Toxicol. — 2013. — Vol. 312, № 4. — P. 36–47.