

УДК 576.524+576.532+576.535

# Клеточные модели для исследования роли экстрацеллюлярного домена муцина MUC1 человека в метастазировании

М. С. Сыркина<sup>1,4\*</sup>, М. А. Рубцов<sup>1</sup>, Д. М. Поташникова<sup>2</sup>, Ю. Д. Кондратенко<sup>1</sup>,  
А. А. Докрунова<sup>3</sup>, В. П. Вейко<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра молекулярной биологии, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра клеточной биологии и гистологии, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

<sup>4</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, корп. 2

\*E-mail: krimsy@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.12.2013

После доработки 20.03.2014

**РЕФЕРАТ** На основе экспрессионного вектора рEGFP-N3 получены генетические конструкции, кодирующие различные комбинации функциональных фрагментов муцина MUC1 человека, а также маркеры для идентификации синтезируемых химерных белков (FLAG-эпитоп, располагающийся в N-концевой области синтезируемых белков, и EGFP, имеющий C-концевую локализацию). Этими конструкциями трансфицировали клетки линии HT-29. Стабильно трансфицированные клетки были охарактеризованы с использованием проточного цитофлуориметра. Высокий уровень экспрессии рекомбинантных белков на фоне низкого уровня эндогенного муцина MUC1 в полученных клетках был подтвержден методом ПЦР в реальном времени. При помощи флуоресцентной микроскопии была показана мембранная локализация химерных белков. Полученные клетки могут служить моделью MUC1-экспрессирующей формы рака, а также использоваться для исследования роли различных функциональных фрагментов муцина MUC1 в метастазировании.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** клеточные модели, метастазирование, муцин, MUC1, HT-29, онкологические заболевания.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** БСА – бычий сывороточный альбумин; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа; ДФСБ – фосфатно-солевой буфер в модификации Дульбекко; ДЭПК – диэтилпирикарбонат; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

## ВВЕДЕНИЕ

Метастазирование – процесс, характеризующийся повышенной способностью клеток к инвазии и трансэндотелиальной миграции, является одним из ключевых в развитии онкологических заболеваний. Появление у опухолевых клеток способности к метастазированию, как правило, ассоциировано с неблагоприятным прогнозом [1]. Молекулярные механизмы процессов, приводящих к изменению метастатического потенциала клеток, активно исследуются на протяжении нескольких десятилетий. Установлено, что в данном процессе принимают участие молекулы, взаимодействующие с внеклеточным матриксом [2, 3] или с молекулами клеточ-

ной адгезии [4, 5]. Одна из таких молекул – муцин MUC1 человека. Экспериментальные данные, указывающие на то, что повышение экспрессии MUC1 коррелирует со снижением способности клеток в культуре к агрегации [6], послужили основанием для предположения об участии данного гликопротеида в увеличении метастатического потенциала опухолевых клеток.

Мембранный гликопротеид MUC1 в норме располагается на апикальной поверхности эпителиальных клеток, выстилающих дыхательные пути и протоки желез, и выполняет функцию их увлажнения и лубрикации. При злокачественной трансформации клеток экспрессия гена MUC1 [7–9] увеличивается,

изменяются клеточная локализация [10, 11] и характер гликозилирования муцина MUC1 [12].

В структуре муцина MUC1 можно выделить несколько функциональных доменов – экстрацеллюлярный, трансмембранный и цитоплазматический. Накопленные к настоящему времени данные, касающиеся влияния различных доменов MUC1 на метастатический потенциал опухолевых клеток, весьма противоречивы [13–15]. Достаточно однозначно установлена лишь роль цитоплазматического домена – идентифицированы сигнальные пути, в которых принимает участие данный фрагмент, и внутриклеточные молекулы, с которыми он взаимодействует [16–18]. Однако функциональная роль экстрацеллюлярного домена MUC1 в данном процессе выяснена не до конца, хотя известно, что изменения, происходящие с молекулой муцина при злокачественной трансформации клетки, затрагивают в основном его экстрацеллюлярную область. Изменение характера гликозилирования внеклеточной части муцина MUC1 в опухолевых клетках приводит к формированию опухоль-специфичных антигенных эпитопов. Предполагается, что характер гликозилирования муцина может существенно влиять на инвазивные характеристики опухолевых клеток. Так, например, было показано, что углеводные компоненты опухоль-ассоциированного (но не «нормального») муцина MUC1 способны связываться с селектинами, продуцируемыми клетками активированного эндотелия [19]. Селектины, в свою очередь, опосредуют взаимодействие с рецепторами на поверхности эндотелиальных клеток, что, по всей видимости, способствует прикреплению метастазирующей клетки к стенке сосуда и ее последующей инвазии. Более того, для метастазирующих клеток характерно наличие определенных гликозидных эпитопов [20, 21]. В случае MUC1 были идентифицированы гликозидные эпитопы *syalil Lewis<sup>a</sup>* (*sLe<sup>a</sup>*) и *syalil Lewis<sup>x</sup>* (*sLe<sup>x</sup>*), присутствие которых ассоциировано со способностью клеток к метастазированию. В частности, показано, что во время неопластической трансформации клеток кишечника содержание *sLe<sup>a</sup>* постепенно увеличивается [22]. Повышенные количества димерных форм *sLe<sup>x</sup>* обнаружены также в субпопуляциях клеток аденокарциномы легкого, обладающих высокой способностью формировать колонии в легких бестимусных мышей [23]. Приведенные данные косвенно указывают на участие экстрацеллюлярного домена муцина MUC1 в повышении метастатического потенциала клеток злокачественных новообразований млекопитающих.

Тем не менее изучение влияния экстрацеллюлярного домена MUC1 на метастазирование опухолевых клеток невозможно без создания адекватных

клеточных моделей. Клеточные модели агрессивной формы MUC1-экспрессирующего рака могли бы использоваться для тестирования как противоопухолевых препаратов, так и диагностических средств, направленных на распознавание экстрацеллюлярной области муцина MUC1. Поскольку экспрессия муцина MUC1 характерна для клеток большинства эпителиальных опухолей, разработка таких агентов позволит охватить широкий спектр онкологических заболеваний.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы

В работе использовали соли производства компании Merck (Германия), а также отечественного производства категории «ос.ч.»; компоненты для получения микробиологических сред (Difco, США); агарозу, ферменты и наборы для проведения ПЦР, ОТ-ПЦР, ПЦР в реальном времени, экстракции фрагментов ДНК из агарозного геля и выделения плазмидной ДНК, а также ДНК- и РНК-маркеры (Thermo Scientific, США), TRIzol (Sigma, США), ДЭПК (Sigma, США).

Для культивирования клеточных линий использовали модифицированную Дульбекко среду Игла (DMEM), раствор Версена, раствор трипсина («ПанЭко», Россия), фетальную сыворотку теленка (Hyclone, США), антибиотики генетицин (G418), пенициллин и стрептомицин (Sigma-Aldrich, США).

### Бактериальные штаммы и клеточные культуры

Штамм JM110 *Escherichia coli* (e14- [F' traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15] hsdR17(rK-mK+)) был получен из музея ФГУП ГосНИИ генетика.

В работе были использованы культуры клеток рака молочной железы (MCF-7), рака шейки матки (HeLa) и колоректальной аденокарциномы (HT-29) человека.

### Синтетические олигонуклеотиды

Олигонуклеотиды, использованные в работе, синтезированы ООО «ДНК-Синтез»; их нуклеотидные последовательности представлены в *табл. 1*.

### Выделение РНК из культуры клеток

Промытые раствором ДФСБ клетки осаждали центрифугированием (4 мин, 1000 об/мин) и ресуспендировали в 1 мл реактива TRIzol. Затем добавляли 200 мкл хлороформа, перемешивали, инкубировали в течение 2–3 мин при комнатной температуре, после чего центрифугировали (15 мин, 13000 об/мин, +4 °С) и отбирали верхнюю водную фазу в чистую пробирку. Добавляли равный объем изопропанола,

инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре и осаждали нуклеиновые кислоты центрифугированием (10 мин, 13000 об/мин, +4 °С). Осадок промывали 75% этанолом, высушивали и растворяли в воде, содержащей 0.1% ДЭПК. ДНК удаляли при помощи ДНКазы I, следуя рекомендациям фирмы-изготовителя.

### Синтез кДНК

кДНК синтезировали методом обратной транскрипции с использованием набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США), следуя рекомендациям изготовителя.

Для наработки кДНК с целью получения фрагментов, кодирующих функциональные фрагменты муцина MUC1, использовали РНК, выделенную из клеток линии MCF-7, и специфические праймеры: USTR\_R – для кДНК(*ustr*) и СТ\_R – для кДНК(*tmct*).

Для наработки кДНК использовали РНК, выделенную из клеток линии HeLa и HT-29. кДНК(GAPDH) получали с использованием олигонуклеотида GAPDH\_R. кДНК(MUC1) получали с использованием олигонуклеотида TM\_R, кДНК(*rMUC1*) – с использованием олигонуклеотида FLAG\_R.

### Получение фрагментов ДНК, кодирующих функциональные фрагменты муцина MUC1

Олигонуклеотиды для получения фрагментов гена муцина выбирали с учетом анализа нуклеотидной последовательности кДНК муцина MUC1 человека [24].

Фрагмент *ustr* получали при помощи ПЦР с кДНК(*ustr*) с использованием праймеров USTR\_F и USTR\_R; фрагмент *tmct* получали при помощи ПЦР с кДНК(*tmct*) с использованием праймеров TM\_F и СТ\_R; фрагмент *tm* получали при помощи ПЦР с кДНК(*tmct*) с использованием праймеров TM\_F(2) и TM\_R. Продукты ПЦР разделяли при помощи электрофореза в 1% агарозном геле и очищали из агарозного геля с использованием набора GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, США). Полученные фрагменты клонировали в составе векторов pUC18 – *ustr* по сайтам XhoI и HindIII, *tm* – по сайтам HindIII и BamHI и *tmct* – по сайту BamHI. В результате были получены плазмиды: pUC18-USTR, pUC18-TM и pUC18-TMCT. Соответствие нуклеотидных последовательностей клонированных фрагментов ожидаемым подтверждали секвенированием.

Фрагмент *tr21* получен по методике, разработанной для получения фрагментов, содержащих различное число tandemных повторов из области VNTR гена MUC1 человека [25], и клонирован в векторе pUC18-TR21 (по сайтам HindIII и BamHI).

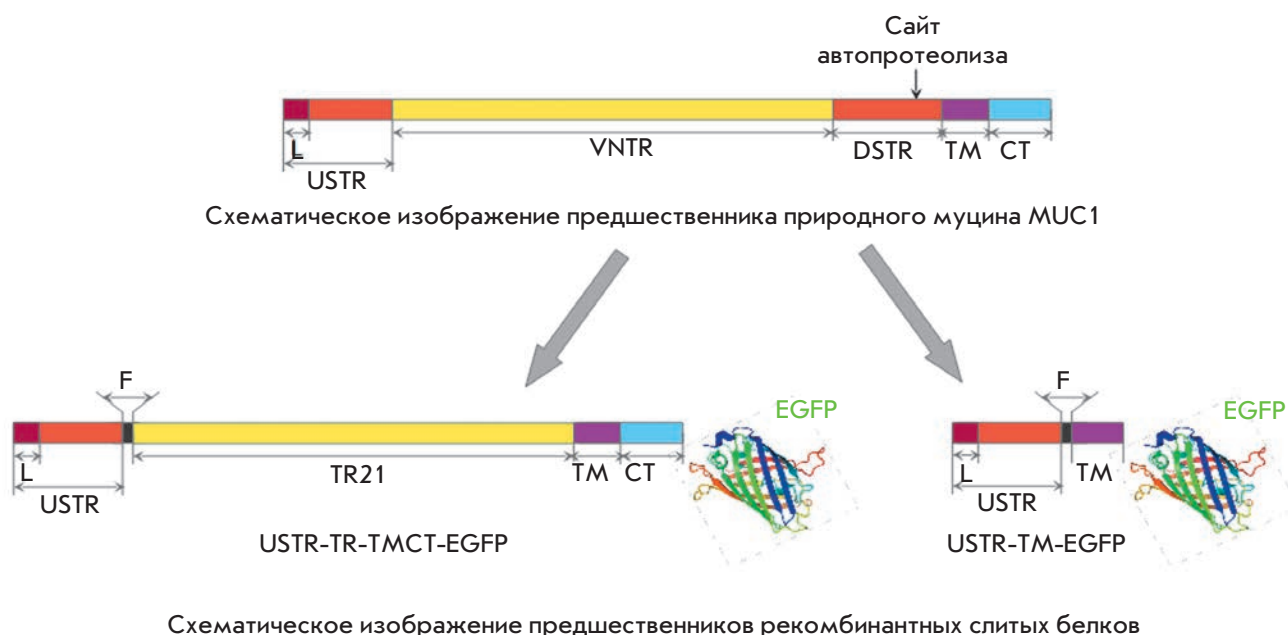
### Создание экспрессионных конструкций, содержащих различные фрагменты гена муцина MUC1

Сборку конструкций осуществляли на основе вектора pEGFP-N3 (Clontech, США). Фрагмент *f* получен путем отжига олигонуклеотидов FLAG\_F и FLAG\_R.

Вектор pUSTR-TR-TMCT-EGFP получен в результате последовательного клонирования фрагментов *ustr* (по сайтам XhoI и HindIII), *tr21* (по сайтам

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Название	Последовательность 5'→3'
FLAG_F	AGCTTGACTACAAGGACGATGACGATAAGA
FLAG_R	AGCTTCTTATCGTCATCGTCCTTGTTAGTCA
USTR_F	ACGTCCTCGAGATGACACCGGGCACCCAGT
TM_F	TGGGGGATCCGTGCCAGGCTGGGGCAT
TM_F(2)	AAGCTTGTGCCAGGCTGGGGCAT
СТ_R	ACGTGGATCCCCAAGTTGGCAGAAGTGGC
TM_R	GCTAGGATCCGCACTGACAGACAGCCAAGGC
USTR_R	TGACAAGCTTCCCCAGGTGGCAGCTGAA
GAPDH_F	CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG
GAPDH_R	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG



**Рис. 1.** Расположение основных функциональных доменов в составе природного муцина MUC1 человека и рекомбинантных слитых белков. L – лидерный пептид; VNTR – область переменных тандемных повторов; TR21 – 21 тандемный повтор из области VNTR; USTR и DSTR – области нерегулярных повторов, расположенные до и после VNTR соответственно; F – FLAG-эпитоп, TM – трансмембранный домен, CT – цитоплазматический домен

HindIII и BamHI), *tmc1* (по сайту BamHI) и *f* (по сайту HindIII). Вектор pUSTR-TM-EGFP получен в результате последовательного клонирования фрагментов *ustr* (по сайтам XhoI и HindIII), *tm* (по сайтам HindIII и BamHI) и *f* (по сайту HindIII). Необходимые фрагменты получали рестрикцией векторов pUC18-USTR, pUC18-TM, pUC18-TMCT и pUC18-TR21 с последующей экстракцией из агарозного геля. Таким образом, были получены экспрессионные векторы pUSTR-TM-EGFP и pUSTR-TR-TMCT-EGFP, содержащие гены слитых белков USTR-TM-EGFP и USTR-TR-TMCT-EGFP соответственно. Схематическое изображение взаимного расположения доменов в составе рекомбинантных белков в сравнении со структурой природного муцина представлено на рис. 1.

### Трансфекция

Для трансфекции клеток использовали вектор pEGFP-N3, а также плазмиды pUSTR-TM-EGFP и pUSTR-TR-TMCT-EGFP. Трансфекцию клеток линии HT-29 осуществляли методом электропорации с использованием прибора Gene Pulser Xcell Total System (Bio-Rad, США). В двухмиллиметровую кювету для электропоратора вносили 20 мкл раствора плазмидной ДНК (0,4 мкг/мкл) и 180 мкл клеточной суспензии (5 млн клеток/мл), перемешивали и подвергали действию электрического поля

(500 В/см, 10 импульсов по 1 мс). Клетки высевали в культуральные чашки и растили в полной среде DMEM в течение 3 дней, затем промывали раствором ДФСБ, добавляли свежую среду DMEM, содержащую антибиотик G418 (700 мкг/мл), и культивировали в течение 10–14 дней. Наиболее ярко светящиеся колонии отбирали и помещали в лунки 96-луночного планшета. Стабильно трансфицированные клетки анализировали при помощи проточного цитофлуориметра (BD FACS AriaIII, США).

### Проточная цитофлуориметрия

Для анализа на проточном цитофлуориметре клетки трижды промывали раствором ДФСБ и ресуспендировали в растворе ДФСБ в количестве около 1 млн клеток/мл.

### Флуоресцентная микроскопия

Клетки высевали на стекла и спустя 24 ч анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ts100 (Nikon, Япония) либо LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Германия).

### ПЦР в реальном времени

ПЦР проводили с использованием готового мастер-микса Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 2X (Thermo Scientific, США), содержащего

Таблица 2. Результаты ПЦР в реальном времени, отражающие содержание мРНК эндогенного муцина в клетках HT-29 и HeLa

мРНК/линия клеток	Средний предельный цикл	Среднее начальное количество	% по отношению к GAPDH
GAPDH / HeLa	25.42	3214.1	100
GAPDH / HT-29	24.19	11795.4	100
MUC1 / HeLa	25.35	4007.57	125
MUC1 / HT-29	28.24	265.28	2.25

интеркалирующий агент SYBR Green. Концентрация праймеров в смесях составляла 0.03 мкмоль/л. Для калибровки использовали четыре разведения образцов кДНК – 10, 100, 1000 и 10000 раз. В качестве контроля проводили реакции в отсутствие кДНК, а также со смесью для обратной транскрипции без обратной транскриптазы M-MuLV. Все реакции проводили в трех повторах.

Уровень экспрессии эндогенного MUC1 в нетрансфицированных клетках определяли с использованием кДНК MUC1 и пары праймеров TM\_F/CT\_R; уровень экспрессии рекомбинантного муцина MUC1 анализировали с использованием кДНК rMUC1 и праймеров USTR\_F/FLAG\_R.

Результаты нормировали по уровню экспрессии гена GAPDH, используя кДНК (GAPDH) и праймеры GAPDH\_F/GAPDH\_R.

#### Определение характера роста клеток, экспрессирующих рекомбинантные белки

Клетки каждой стабильной линии – HT-29\_EGFP, HT-29\_USTR-TM-EGFP и HT-29\_USTR-TR-TMCT-EGFP – высевали в культуральные чашки диаметром 3.5 см по 500000 клеток на чашку. После культивирования в течение 3 дней клетки промывали раствором ДФСБ и анализировали характер роста при помощи микроскопа. Количество клеток определяли методом подсчета в камере Горяева.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Выбор клеточной линии

При выборе клеточной линии для создания необходимых моделей следует учитывать ряд требований.

Поскольку клеточные модели предполагается использовать для изучения свойств молекулы, предположительно, увеличивающей метастатический потенциал клеток, для создания таких моделей следует выбирать клетки с исходно невысокой способностью к метастазированию.

Кроме того, в идеальном случае в клетках не должен экспрессироваться эндогенный муцин MUC1, чтобы избежать неоднозначности результатов. Однако клетки около 90% злокачественных новообразований содержат муцин MUC1, что предполагает использование линии опухолевых клеток с существенно пониженным уровнем экспрессии эндогенного MUC1.

Для выбора клеток важен также тип гликозилирования муцина. В работе, выполненной M.D. Burdick и соавт. в 1997 г. [20], были проанализированы формы гликозилирования рекомбинантного муцина MUC1, выделенного из клеток четырех различных линий. По результатам гибридизации гликопротеида с моноклональными антителами, полученными к наиболее распространенным опухоль-ассоциированным гликозидным эпитомам, встречающимся у природного муцина, было установлено, что только рекомбинантный муцин, выделенный из клеток линии HT-29, содержит эпитопы sLe<sup>a</sup> и sLe<sup>x</sup> [20], характерные для клеток агрессивных форм опухолей эпителиального происхождения. Согласно опубликованным данным [2], клетки линии HT-29 обладают также низким метастатическим потенциалом.

Мы сравнили уровни экспрессии эндогенного муцина в клетках линий HT-29 и HeLa методом ПЦР в реальном времени.

Известно, что в результате альтернативного сплайсинга мРНК муцина MUC1 в клетках может образоваться несколько изоформ муцина MUC1, в том числе секреторируемые [26]. В нашем случае существенной была оценка уровня экспрессии только мембранно-связанных форм данного гликопротеида, поэтому для постановки реакции мы использовали праймеры TM\_F и TM\_R, отжигающиеся в области кДНК, кодирующей трансмембранный домен MUC1. Результаты определения уровня экспрессии гена MUC1 в клетках линий HT-29 и HeLa представлены в табл. 2.

Результаты ПЦР в реальном времени показывают, что количество мРНК муцина MUC1 в клетках ли-



USTR  
 MTPGTQSPFFLLLLLTVLTAATTAPKPAIVVVTGSGHASSTPGEEKGTSATQRSSVPSSTEKNAVSMTSSVL  
 SSHSPGSSTTQGQDVTLPATEPAPSGSAATWG

TR21  
 (показано 5 повторов)  
 GSTAPPANGVTSAPDTRPAPGSTAPPANGVTSAPDTRPAPGSTAPPANGVTSAPDTRPAPGSTAPPANGV  
 TSAPDTRPAPGSTAPPANGVTSAPDTRPAP...

TM  
 KLGWGIALLVLCVLAIVYLIALAVCQC

CT  
 RRKNYGQLDIFPARDTYNPMSEYPTYHTHGRYVPPSSSTRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL

Рис. 2. Первичная структура фрагментов муцина MUC1, использованных при создании конструкций. Голубым цветом выделены потенциальные сайты O-гликозилирования, зеленым – последовательность, закрепляющая белок в плазматической мембране. Красным шрифтом выделена последовательность лидерного пептида

нии HT-29 приблизительно на два порядка ниже, чем в клетках линии HeLa. Это свидетельствует о невысоком базовом уровне экспрессии гена *MUC1* в клетках линии HT-29.

Таким образом, на основании опубликованных данных и результатов собственных экспериментов для создания моделей опухолевых клеток, экспрессирующих рекомбинантные белки, содержащие определенные функциональные фрагменты муцина MUC1 человека, мы выбрали линию клеток HT-29.

### Создание модельных конструкций

При изучении роли различных функциональных фрагментов MUC1 большинство исследователей, как правило, используют ДНК, кодирующую природный MUC1 [27–29]. Однако природный MUC1 представляет собой гетеродимер, в котором экстрацеллюлярная N-концевая субъединица соединена с мембранно-связанной при помощи стабильных нековалентных взаимодействий. Данные взаимодействия могут нарушаться, что приводит к «сбрасыванию» N-концевой субъединицы с поверхности клетки [30]. Диссоциация в ходе исследования субъединицы белка, содержащей область экстрацеллюлярного домена муцина, может приводить к искажению получаемых результатов. Таким образом, нам нужно было сконструировать гены рекомбинантных белков, которые не имеют сайтов автопротеолиза, но содержат необходимые функциональные фрагменты.

Основное отличие опухоль-ассоциированного муцина MUC1 заключается в наличии определенных

гликозидных эпитопов на поверхности экстрацеллюлярного домена: углеводные компоненты молекулы, как предполагается, вовлечены во взаимодействие с молекулами внеклеточного матрикса и, как следствие, участвуют в процессе метастазирования. Следовательно, конструируемый рекомбинантный белок обязательно должен содержать фрагменты внеклеточного домена, несущие сайты O-гликозилирования. Большое количество остатков Ser и Thr, к которым, предположительно, присоединяются олигосахариды, располагается в области tandemных повторов (VNTR) – каждый повтор, содержащий 20 аминокислотных остатков, включает в себя пять потенциальных сайтов O-гликозилирования. Следуя методике, разработанной для конструирования фрагментов, кодирующих различное количество повторов из области VNTR муцина MUC1 человека [25], был получен фрагмент, кодирующий 21 tandemный повтор (рис. 2).

Кроме того, большое количество потенциальных сайтов O-гликозилирования характерно для областей вырожденных повторов (USTR и DSTR). Поскольку область DSTR содержит сайт автопротеолиза, этот фрагмент при конструировании не использовали. В то же время для создания конструкций необходимо было получить фрагмент ДНК, кодирующий последовательность USTR (см. рис. 2).

Наконец, для того чтобы экстрацеллюлярный домен MUC1, входящий в состав рекомбинантных белков, был экспонирован во внеклеточное пространство, он должен содержать, по меньшей мере, трансмем-

бренный домен (ТМ) и последовательность ССС, обеспечивающую мембранную локализацию гликопротеида [31]. Аминокислотная последовательность трансмембранного домена приведена на *рис. 2*.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая цитоплазматический домен (СТ, см. *рис. 2*), необходима для конструирования гена «полноразмерного» муцина, лишённого только области, кодирующей сайт автопротеолиза и часть вырожденных повторов.

Фрагменты, кодирующие USTR, ТМ и СТ муцина MUC1 человека, были амплифицированы с кДНК муцина MUC1, синтезированной на суммарной мРНК из клеток рака молочной железы MCF-7.

С использованием перечисленных выше фрагментов были созданы две экспрессионные конструкции, содержащие гены химерных белков, слитых на С-конце с EGFP, – «полноразмерного» MUC1 (pUSTR-TR-TMCT-EGFP) и лишённого тандемных повторов и цитоплазматического домена (pUSTR-TM-EGFP) (*рис. 1*).

Между областью тандемных повторов и фрагментом, кодирующим вырожденные повторы, мы дополнительно ввели последовательность, кодирующую FLAG-эпитоп, чтобы иметь возможность выявлять N-концевую область рекомбинантных белков при помощи специфических антител.

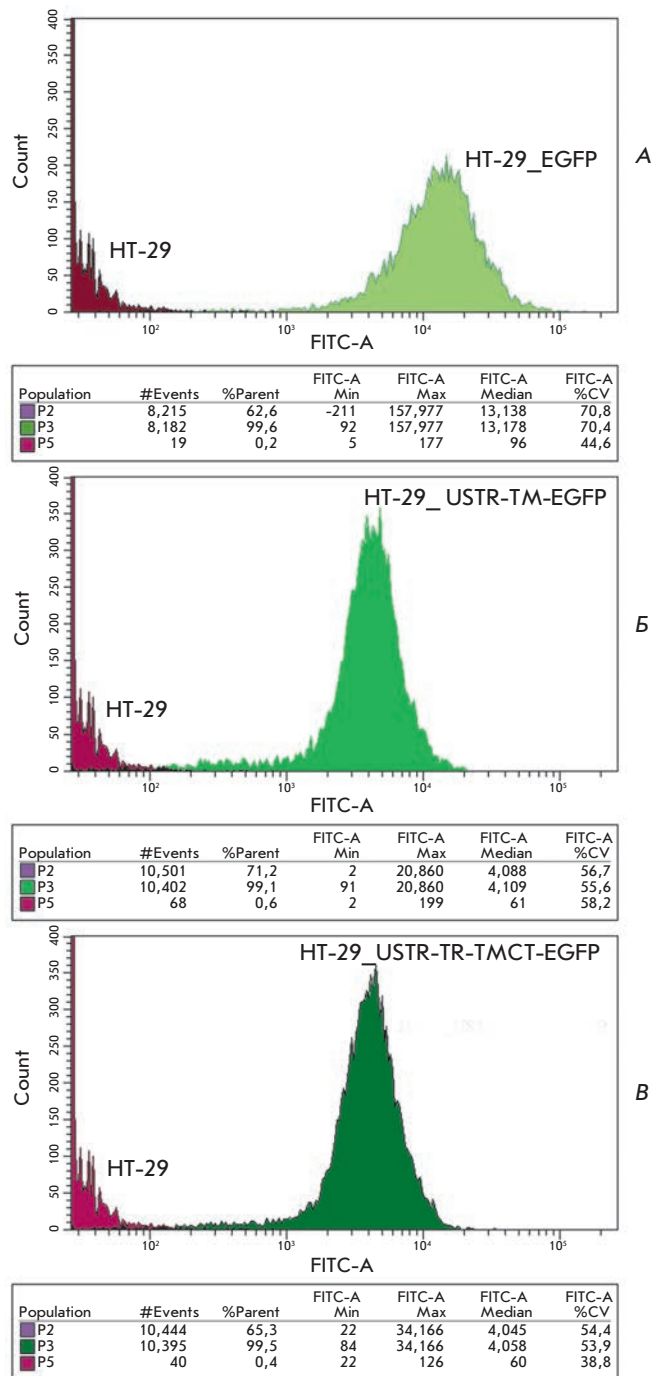
### Получение и характеристика клеточных моделей

Экспрессию рекомбинантных белков анализировали при помощи проточной цитофлуориметрии в стабильно трансфицированных клетках линии HT-29 по флуоресценции EGFP (*рис. 3*).

Уровень экспрессии рекомбинантного муцина (rMUC1) в стабильно трансфицированных клетках определяли методом ПЦР в реальном времени и сравнивали с экспрессией гена домашнего хозяйства GAPDH. Результаты определения уровня экспрессии генов рекомбинантных белков в стабильно трансфицированных клетках линии HT-29 представлены в *табл. 3*.

Показано, что содержание мРНК рекомбинантных белков USTR-TM-EGFP и USTR-TR-TMCT-EGFP в стабильно трансфицированных клетках HT-29\_USTR-TM-EGFP и HT-29\_USTR-TR-TMCT-EGFP составляет приблизительно 20% от содержания мРНК GAPDH. Учитывая, что содержание мРНК эндогенного муцина MUC1 в клетках линии HT-29 составляет 2.25% (*табл. 2*), можно сделать вывод, что в стабильно трансфицированных клетках линии HT-29 мРНК рекомбинантного муцина составляет примерно 85% всей мРНК MUC1 (рекомбинантного и эндогенного).

Анализ локализации рекомбинантных белков методом флуоресцентной микроскопии показал, что в клетках HT-29\_EGFP наблюдается цитоплазма-



**Рис. 3.** Флуоресценция клеток HT-29, стабильно трансфицированных векторами pEGFP-N3 (A), pUSTR-TM-EGFP (Б), pUSTR-TR-TMCT-EGFP (Б)

тическая и ядерная локализация сигнала в зеленой области спектра (*рис. 4А*), в то время как в клетках HT-29\_USTR-TM-EGFP и HT-29\_USTR-TR-TMCT-EGFP сигнал преимущественно локализуется в области плазматической мембраны (*рис. 4Б,В*).

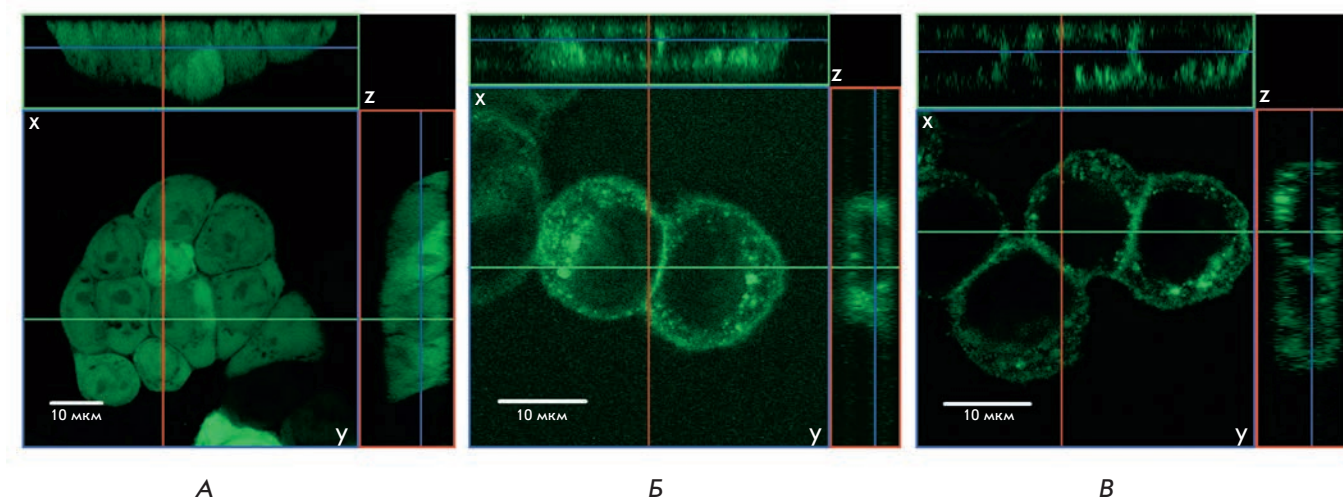


Рис. 4. Локализация флуоресценции EGFP в стабильно трансфицированных клетках линии HT-29. А – HT-29\_EGFP, Б – HT-29\_USTR-TM-EGFP, В – HT-29\_USTR-TR-TMCT-EGFP. Верхняя и боковая панели каждого изображения показывают оптический срез трехмерного изображения в плоскости xz и yz соответственно

Таблица 3. Результаты ПЦР в реальном времени, отражающие содержание мРНК рекомбинантных белков в стабильно трансфицированных клетках линии HT-29

мРНК/линия клеток	Средний предельный цикл	Среднее начальное количество	% по отношению к GAPDH
GAPDH / HT-29_EGFP	14.30	730.65	100
GAPDH / HT-29_USTR-TM-EGFP 1	12.76	1922.36	100
GAPDH / HT-29_USTR-TR-TMCT-EGFP	13.21	1347.97	100
rMUC1 / HT-29_EGFP-N3	22.62	0.94	0.129
rMUC1 / HT-29_USTR-TM-EGFP 1	14.34	373.82	19.446
rMUC1/HT-29_USTR-TR-TMCT-EGFP	14.75	278.03	20.626

Анализ трехмерных изображений, полученных с применением конфокальной микроскопии, показал, что белки, содержащие фрагменты муцина, слитые с EGFP, имеют преимущественно периферическую мембранную локализацию, в отличие от белка EGFP, ожидаемо детектируемого как в цитоплазме, так и в ядре (рис. 4, верхняя и боковая панели каждого изображения).

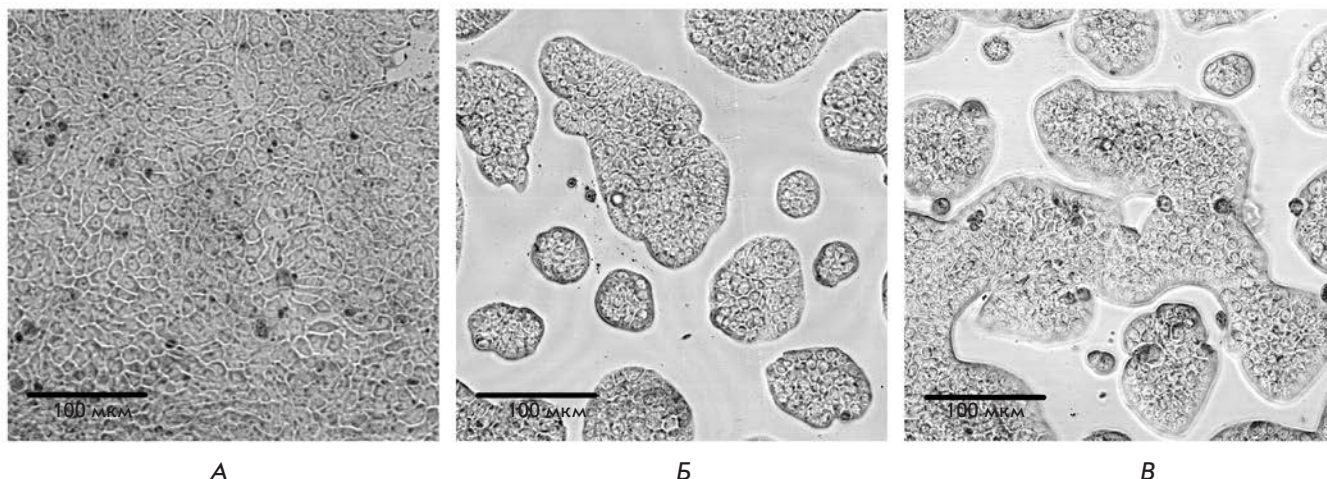
Наконец, нами установлено различие в характере роста клеток полученных линий. В то время как клетки HT-29\_EGFP по мере роста формируют монослой (рис. 5А), клетки HT-29\_USTR-TM-EGFP и HT-29\_USTR-TR-TMCT-EGFP склонны к формированию обособленных «островков» (рис. 5Б,В). Учитывая, что в данном эксперименте на чашки высевали оди-

наковое количество клеток (500000), а после 3 дней культивирования их число также отличалось незначительно, различие в скорости деления можно исключить. Наблюдаемая нами картина является свидетельством различия адгезионных характеристик клеток полученных линий, вызванного присутствием на их поверхности рекомбинантных белков, содержащих фрагменты муцина MUC1.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На базе клеток линии HT-29 получены клеточные модели, экспрессирующие слитые с EGFP белки, представляющие на внешней поверхности клеток фрагменты экстрацеллюлярного домена муцина MUC1 человека, несущие сайты O-гликозилирования.





**Рис. 5.** Влияние экспрессии рекомбинантных белков на характер роста стабильно трансфицированных клеток линии HT-29 в культуре. А – клетки, экспрессирующие EGFP, Б – клетки, экспрессирующие USTR-TM-EGFP, В – клетки, экспрессирующие USTR-TR-TMCT-EGFP

Основное различие полученных нами моделей заключается в наличии или отсутствии в структуре рекомбинантных белков области, содержащей 21 тандемный повтор. Эти модели отличаются высоким уровнем экспрессии рекомбинантных белков на фоне низкой экспрессии эндогенного муцина MUC1. Характер роста модельных клеток отличается от роста клеток, экспрессирующих EGFP. ●

*Авторы выражают благодарность И.А. Воробьеву (кафедра клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова), а также А.Ю. Архиповой, А.А. Рамоновой и М.М. Мойсеновичу (кафедра*

*биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова) за содействие и помощь в проведении экспериментов.*

*Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова (клеточный сортер FACSAria SORP (BD), конфокальный микроскоп Carl Zeiss LSM 510 Meta).*

*Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (соглашение № 8800) и РФФИ (гранты № 12-04-33031, 12-04-31338, 12-04-31721, 13-04-01875).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wyld L., Gutteridge E., Pinder S.E., James J.J., Chan S.Y., Cheung K.L., Robertson J.F., Evans A.J. // Br. J. Cancer. 2003. V. 89. № 2. P. 284–290.
- Haier J., Nasralla M., Nicolson G.L. // Br. J. Cancer. 1999. V. 80. № 12. P. 1867–1874.
- Doerr M.E., Jones J.I. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. № 5. P. 2443–2447.
- Varki A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. № 16. P. 7390–7397.
- Qi J., Chen N., Wang J., Siu C.H. // Mol. Biol. Cell. 2005. V. 16. № 9. P. 4386–4397.
- Hilkens J., Ligtenberg M.J., Vos H.L., Litvinov S.V. // Trends Biochem. Sci. 1992. V. 17. № 9. P. 359–363.
- Dong Y., Walsh M.D., Cummings M.C., Wright R.G., Khoo S.K., Parson P.G., McGuckin M.A. // J. Pathol. 1997. V. 183. № 3. P. 311–317.
- Hinoda Y., Ikematsu Y., Horinochi M., Sato S., Yamamoto K., Nakano T., Fukui M., Suehiro Y., Hamanaka Y., Nishikawa Y., et al. // J. Gastroenterol. 2003. V. 38. № 12. P. 1162–1166.
- McGuckin M.A., Walsh M.D., Hohn B.G., Ward B.G., Wright R.G. // Hum. Pathol. 1995. V. 26. № 4. P. 432–439.
- Li Y., Ren J., Yu W., Kuwahara H., Yin L., Carraway K.L. 3rd, Kufe D. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 38. P. 35239–35242.
- Schroeder J.A., Adriance M.C., Thompson M.C., Camenisch T.D., Gendler S.J. // Oncogene. 2003. V. 22. № 9. P. 1324–1332.
- Burchell J., Taylor-Papadimitriou J., Boshell M., Gendler S., Duhig T. // Int. J. Cancer. 1989. V. 44. № 4. P. 691–696.
- Rahn J.J., Chow J.W., Horne G.J., Mah B.K., Emerman J.T., Hoffman P., Hugh J.C. // Clin. Exp. Metastasis. 2005. V. 22. № 6. P. 475–483.
- Bernier A.J., Zhang J., Lillehoj E., Shaw A.R., Gunasekara N., Hugh J.C. // Mol. Cancer. 2011. V. 10. № 93. P. 1295–1304.
- Roy L.D., Sahraei M., Subramani D.B., Besmer D., Nath S., Tinder T.L., Bajaj E., Shanmugam K., Lee Y.Y., Hwang S.I., et al. // Oncogene. 2011. V. 30. № 12. P. 1449–1459.
- Bafna S., Kaur S., Batra S.K. // Oncogene. 2010. V. 29. № 20. P. 2893–2904.
- Ren J., Bharti A., Raina D., Chen W., Ahmad R., Kufe D. // Oncogene. 2006. V. 25. № 1. P. 20–31.

18. Wei X., Xu H., Kufe D. // *Cancer Cell*. 2005. V. 7. № 2. P. 167–178.
19. Nakamori S., Kameyama M., Imaoka S., Furukawa H., Ishikawa O., Sasaki Y., Izumi Y., Irimura T. // *Dis. Colon. Rectum*. 1997. V. 40. № 4. P. 420–431.
20. Burdick M.D., Harris A., Reid C.J., Iwamura T., Hollingsworth M.A. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 39. P. 24198–24202.
21. Julien S., Lagadec C., Krzewinski-Recchi M.A., Courtand G., Le Bourhis X., Delannoy P. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2005. V. 90. № 1. P. 77–84.
22. Gong E., Hirohashi S., Shimosato Y., Watanabe M., Ino Y., Teshima S., Kodaira S. // *J. Natl. Cancer Inst.* 1985. V. 75. № 3. P. 447–454.
23. Inufusa H., Kojima N., Yasutomi M., Hakomori S. // *Clin. Exp. Metastasis*. 1991. V. 9. № 3. P. 245–257.
24. Gendler S.J., Lanscater C.A., Taylor-Papadimitriou J., Duhig T., Peat N., Burchell J., Pemberton L., Lalani E.N., Wilson D. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. № 25. P. 15286–15293.
25. Гулько Л.Б., Павлова О.В., Дьяков Н.А., Окорокова Н.А., Ратманова К.И., Логунова Н.Н., Бобренева Р.А., Макаров В.А., Юрин В.Л., Вейко В.П. и др. // *Биоорг. химия*. 2000. Т. № 6. С. 423–432.
26. Imbert Y., Darling D.S., Jumblatt M.M., Foulks G.N., Couzin E.G., Steele P.S., Young W.W. Jr. // *Exp. Eye Res.* 2006. V. 83. № 3. P. 493–501.
27. Ligtenberg M.J., Kruijshaar L., Buijs F., van Meijer M., Litvinov S.V., Hilkens J. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 9. P. 6171–6177.
28. Schroeder J.A., Thompson M.C., Gardner M.M., Gendler S.J. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 16. P. 13057–13064.
29. Rahn J.J., Shen Q., Mah B.K., Hugh J.C. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 28. P. 29386–29390.
30. Julian J., Dharmaraj N., Carson D.D. // *J. Cell. Biochem.* 2009. V. 108. № 4. P. 802–815.
31. Pemberton L.F., Rughetti A., Taylor-Papadimitriou J., Gendler S.J. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 4. P. 2332–2340.