

Экспрессия гена дефенсина-6 (HD-6) в линиях опухолевых клеток человека

И. Л. Лисовский, А. И. Хобта, М. А. Солдаткина, Д. И. Литвин, Н. В. Маркеева, Л. Л. Сидорик¹, П. В. Погребной

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины
Ул. Васильковская, 45, Киев, 03022, Украина

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

В работе исследована экспрессия гена дефенсина-6 (HD-6) в злокачественно трансформированных линиях клеток человека различного гистогенеза: A431 (эпидермальная карцинома), САМ (Т-клеточная лимфома), МоИ-4 (Т-клеточная лимфома), КВ (эпидермоидная карцинома), HeLa (эпителиоидная карцинома), Colo 320HSR (аденокарцинома), U251 (глиобластома). С использованием метода RT-PCR показано наличие экспрессии данного гена во всех вышеуказанных линиях клеток. Полученные результаты позволяют предположить, что некоторые виды неопластической трансформации клеток приводят к дерегуляции экспрессии генов дефенсинов, в частности, гена HD-6.

Введение. Продукция антимикробных пептидов является важной составляющей защиты организма у эукариот. В последние 20 лет десятки антимикробных пептидов были обнаружены у растений и многоклеточных организмов — от моллюсков до человека. Одни из них продуцируются конститутивно, другие индуцируются в ответ на инфекцию или воспаление [1]. Большинство антимикробных пептидов позвоночных принадлежит к семейству дефенсинов — катионных пептидов с молекулярной массой от 3 до 6 кДа, содержащих 3—4 внутримолекулярные дисульфидные связи, формирующие характерную β -складчатую структуру [2—4]. На основе расположения шести консервативных остатков цистеина дефенсины позвоночных подразделяются на два класса — α и β [4, 5]. α -Дефенсины продуцируются нейтрофилами и клетками Пенета кишечника, а β -дефенсины — преимущественно эпителиальными клетками кожи, почек, трахеи, бронхов, где они секретируются в ответ на инвазию микроорганизмов либо регулируются стимуляцией липополисахаридом или TNF- α [5—7]. У человека идентифицированы два типа β -дефенсинов — β -1 и β -2. Первый экспрессируется в клетках поверхно-

стного эпителия урогенитального тракта и легких [8, 9], а экспрессия β -дефенсина-2 идентифицирована в коже и эпителии воздухоносных путей, где индуцируется в кератиноцитах в ответ на инфекцию или воспаление [10—12].

Эти пептиды имеют широкий спектр антимикробной активности против бактерий, грибов и даже некоторых инкапсулированных вирусов [13]. Структура дефенсинов (катионная полярная молекула с разобщенными гидрофобным и заряженным доменами) обуславливает механизм их действия: разрушение мембран за счет формирования в них мультимерных пор [14, 15]. Дефенсины могут также играть важную роль в защите организма благодаря их способности хемоаттрактировать Т-лимфоциты [16, 17] и активировать классический путь комплемента [18].

Дефенсины человека кодируются кластером из семи двухэкзонных генов, локализованных в 8-й хромосоме и демонстрирующих значительную гомологию в кодирующей части. Трансляция мРНК дефенсинов приводит к образованию предшественников, состоящих из 65—99 аминокислотных остатков (а. о.). Их протеолиз ведет к образованию зрелых молекул, содержащих 28—42 а. о., цепь которых стабилизирована тремя дисульфидными связями [2—5, 19]. Продукция этих пептидов ха-

© И. Л. ЛИСОВСКИЙ, А. И. ХОБТА, М. А. СОЛДАТКИНА,
Д. И. ЛИТВИН, Н. В. МАРКЕЕВА, Л. Л. СИДОРИК,
П. В. ПОГРЕБНОЙ, 2000

рактерна для различных эпителиальных клеток, клеток костного мозга, а также лейкоцитов. Так, продукты экспрессии генов HNP-1 и HNP-3 (human neutrophil peptide) детектируются в нейтрофилах, HP-4 (human peptide) — в клетках костного мозга, hBD-1 и hBD-2 (human beta defensin) — в эпителиальных клетках ротовой полости и дыхательных путей, HD-5 и HD-6 (human defensin) — в клетках кишечника, а именно: в клетках Пенета. Экспрессия генов дефенсинов обнаруживается в низкодифференцированных активно пролиферирующих клетках и регенерирующих тканях.

Показано, что вирусная и бактериальная инфекции часто являются важным фактором процесса канцерогенеза [20—24]. Как следствие, возникает вопрос о возможной связи экспрессии генов дефенсинов со злокачественной трансформацией клеток. Так, на сегодняшний день мРНК гена hBD-1 детектирована в культурах опухолевых клеток Ca-9, SCC-9, HSC-4; мРНК гена hBD-2 — в этих же клетках, а также в линиях клеток SAS и KB [12].

Ранее нами была получена линия человеческих эпителиальных клеток A431/1522, трансфицированная геном TGF- α человека [25] и секретирующая пептид с молекулярной массой ~3 кДа, обладающий антимикробной активностью и свойствами, подобными дефенсинам человека [26]. Мы предположили, что экспрессия генов дефенсинов может быть индуцирована действием ростовых факторов, в частности, TGF- α , суперэкспрессия которых наблюдается при злокачественной трансформации клеток [27]. Для проверки этой гипотезы необходимо было определить уровень экспрессии генов дефенсинов в разных типах трансформированных клеток человека. Цель данной работы состояла в изучении экспрессии гена HD-6 в линиях опухолевых клеток человека.

Материалы и методы. Клеточные линии. В работе использовали линии злокачественно трансформированных клеток различного гистогенеза: A431 (эпидермальная карцинома), СЕМ (Т-клеточная лимфома), Molt-4 (Т-клеточная лимфома), KB (эпидермоидная карцинома), HeLa (эпителиоидная карцинома), Colo 320HSR (аденокарцинома), U251 (глиобластома). Клетки выращивали до монослоя в среде DMEM («Gibco», Великобритания), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco»), при температуре 37 °С в атмосфере 5 %-го CO₂ и 95 %-й влажности.

Выделение РНК. РНК выделяли по методике [28] в пробирках типа Eppendorf. К осадку клеток прибавляли 500 мкл лизирующего буфера (4 М гуанидинтиоцианат, 25 мМ цитрат натрия, рН 7,0; 0,5 %-й саркозил, 0,1 %-й β -меркаптоэтанол). К

лизату добавляли 0,1 мл 2 М цитрата натрия, рН 4,0, и после перемешивания инкубировали в течение 15 мин на льду. Далее в пробирку вносили равный объем смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (1:1:0,02) и после перемешивания центрифугировали на протяжении 15 мин при 10000 g. Затем супернатант переносили в новые пробирки и переосаждали РНК двумя объемами 96 %-го этанола. Осадок промывали 70 %-м этанолом. Качество выделенной РНК определяли электрофоретически в 1 %-м агарозном геле, содержащем формальдегид (рис. 1). Концентрацию суммарного препарата РНК определяли спектрофотометрически, выход его составлял 10—20 мкг на 10⁶ клеток.

Подбор олигонуклеотидных затравок и постановка RT-PCR. Олигонуклеотидные затравки подбирали с использованием нуклеотидной базы данных Американского Центра Биотехнологической Информации (NCBI) и компьютерной программы Oligo. Подобранные следующие олигонуклеотидные затравки: 5'-aggctgatgccsaggagcag и 5'-tggsaatgtatgggacacacga. На геномной ДНК человека созданы следующие оптимальные условия амплификации: денатурация — 95 °С, 20 с, отжиг — 64 °С, 30 с, синтез — 72 °С, 45 с. Концентрация MgCl₂ в реакционной смеси составляла 1,5 мМ.

кДНК синтезировали по стандартной методике на протяжении 1 ч при температуре 37 °С в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 3 мкл 10 × буфера, 1 мкл dNTP (2,5 мМ), 20 пикомоль олигонук-

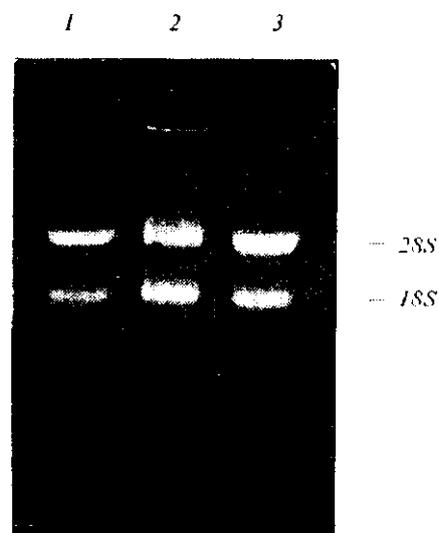


Рис. 1. Электрофореграмма суммарных препаратов РНК в 1 %-ном агарозном геле, содержащем формальдегид: 1 — суммарная РНК клеток A431; 2 — клеток СЕМ; 3 — клеток Molt-4

леотида 5'-tggcaatgtatgggacacagca, 1 мкг суммарной РНК и 150—200 ед. M-MuLV РНК-зависимой ДНК полимеразы (MBI Fermentas #EP 0351, Литва). 2 мкл этой смеси вносили в амплификационную реакцию смесь, содержащую 5 мкл 10 × буфера, 2 мкл dNTP (2,5 мМ), по 20 пмоль каждого из праймеров, 1,5 мкл MgCl₂ (50 мМ) и 1,5 ед. Taq-полимеразы (MBI Fermentas #K0163). Амплификацию осуществляли при следующих температурных режимах: денатурация — 95 °С, 15 с, отжиг/синтез — 64 °С, 30 с на протяжении 40 циклов в амплификаторе Perkin Elmer 2400. Продукты амплификации детектировали в 2 %-м агарозном геле.

Результаты и обсуждение. При исследовании экспрессии гена HD-6 в культурах опухолевых клеток человека олигонуклеотидные затравки для проведения RT-PCR были подобраны таким образом, чтобы они имели место отжига на соседних экзонах гена. Это предоставило возможность проведения RT-PCR на суммарном препарате РНК, выделенном по методу [28] без дополнительной очистки мРНК, поскольку отжиг праймеров на разных экзонах исключает получение ложного результата за счет контаминации образца тотальной РНК примесью ДНК. В случае попадания геномной ДНК в процессе выделения в образец РНК при проведении реакции PCR на ДНК-матрице амплифицируется фрагмент большего размера, чем с кДНК-матрицы, синтезированной в реакции обратной транскрипции, за счет содержания последовательности интронного участка. В данном случае подобранные олигонуклеотидные затравки фланкировали фрагмент размером 1194 п. н. на ДНК-мат-

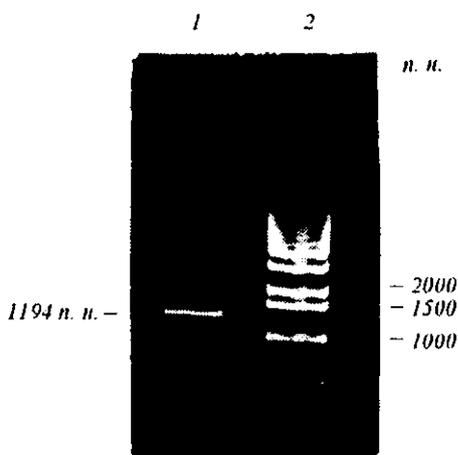


Рис. 2. Электрофореграмма продукта амплификации фрагмента гена HD-6: 1 — амплифицированный фрагмент гена HD-6; 2 — маркер молекулярной массы 1 тыс. п. н. ДНК ladder («Gibco», Великобритания)

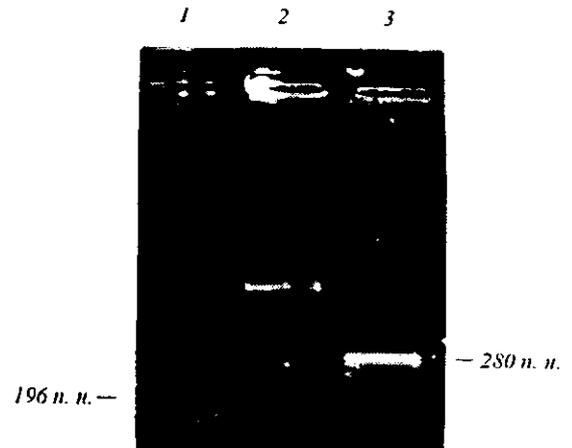


Рис. 3. Электрофореграмма продукта амплификации фрагмента кДНК гена HD-6 и его рестрикционного фрагмента: 1 — продукт рестрикции AluI фрагмента кДНК HD-6; 2 — маркер молекулярной массы pUC19/MspI; 3 — амплифицированный фрагмент кДНК HD-6

рице (рис. 2) и фрагмент размером 280 п. н. на кДНК-матрице (рис. 3). Рестрикционный анализ полученного в результате RT-PCR фрагмента полностью подтверждает соответствие данного продукта PCR-фрагменту мРНК гена HD-6.

После проведения RT-PCR на РНК-матрице клеток A431, CAM, Molt-4, KB, HeLa, Colo 320HSR и U251 на геле детектируется фрагмент размером 280 п. н. во всех исследованных образцах, что свидетельствует о наличии экспрессии гена HD-6 во всех вышеуказанных линиях клеток (рис. 4). В контрольном образце РНК, выделенной из цельной крови, фрагмент такого размера не детектируется. Несмотря на то, что реакцию проводили в стандартных условиях, после электрофоретического анализа PCR-продукты в геле детектируются с разной интенсивностью, что может свидетельствовать о разном уровне экспрессии гена HD-6 в разных типах опухолевых клеток. Возможно, это связано с тем, что при злокачественной трансформации нарушается жесткий контроль над экспрессией тех или иных генов.

Экспрессия генов дефенсинов определяется в разных типах человеческих эпителиальных клеток кожи, урогенитального и пищеварительного трактов, дыхательных путей [29—31]. Однако наши знания об экспрессии генов дефенсинов в опухолевых клетках ограничены. Например, в линии подчелюстных эпителиоидных карциномных клеток

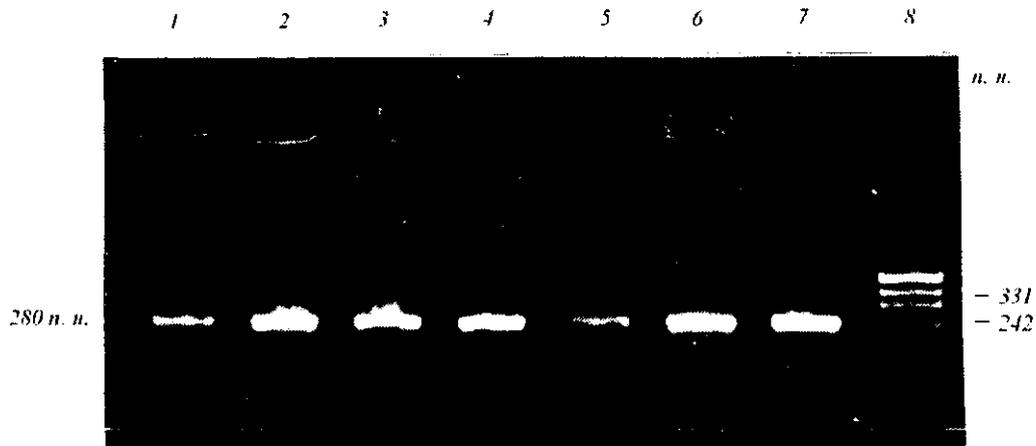


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента кДНК *HD-6* в линиях опухолевых клеток человека: A431 (1); CEM (2); Colo 320HSR (3); Molt-4 (4); KB (5); HeLa (6); U251 (7); 8 — маркер молекулярной массы *pUC19/MspI*

экспрессия гена *hBD-1* не обнаруживается даже после стимуляции цитокинами воспаления [30]. Также показано, что клеточные линии SAS и KB (злокачественные линии эпителия дыхательных путей) не транскрибируют гена *hBD-1* и что воспалительные стимулы не индуцируют его экспрессии в клетках линии SAS [12]. Известно, что геном опухолевых клеток нестабилен [32]. Следствием этого может быть дерегуляция экспрессии генов дефенсинов в клетках линий SAS и KB. Невысокий уровень экспрессии гена *HD-6*, отмеченный нами в клетках Colo 320HSR и U251, возможно, компенсируется экспрессией других генов дефенсинов, что будет исследовано в дальнейшем.

Обнаруженная в данной работе мРНК гена *HD-6* в клетках линий Molt-4 и CEM (Т-лимфомы) является первым свидетельством экспрессии данного гена в иммунокомпетентных клетках, так как ранее в них были обнаружены только α -дефенсин-1 и α -дефенсин-3.

На основании полученных результатов нельзя однозначно судить о физиологической значимости экспрессии гена *HD-6* в злокачественно трансформированных клетках, но, возможно, запущенный механизм экспрессии данного гена дает преимущество опухолевым клеткам в клеточной селекции перед клетками нормального фенотипа, способствуя формированию у них более высокого уровня резистентности по отношению к влиянию цитотоксичных факторов внешней среды. Помимо антимикробной функции дефенсина могут выполнять регуляторную роль при злокачественной трансформации, обусловленную широким спектром их биологической активности [26].

Дальнейшее изучение особенностей экспрессии

генов дефенсинов позволит расширить наши представления об их регуляции и определить их биологическую роль. Наконец, регуляция биосинтеза этих пептидов фармакологически может быть существенна в предотвращении и лечении не только инфекций, но и, возможно, некоторых видов онкопатологий.

I. Л. Лисовський, А. І. Хобта, М. А. Солдаткіна, Д. І. Литвін, Н. В. Маркєєва, Л. Л. Сидорик, П. В. Погребній

Экспрессия гена дефенсину-6 (*HD-6*) у ліній пухлинних клітин людини

Резюме

У роботі досліджено експресію гена дефенсину-6 (*HD-6*) у злоякісно трансформованих лініях клітин людини різного гістогенезу: A431 (епідермальна карцинома), CAM (Т-клітинна лімфома), Molt-4 (Т-клітинна лімфома), KB (епідермоїдна карцинома), HeLa (епітеліоїдна карцинома), Colo 320HSR (аденокарцинома), U251 (гліобластома). З використанням методу RT-PCR виявлено експресію даного гена в усіх вищезазначених лініях клітин. Отримані результати дозволяють припустити, що деякі види неопластичної трансформації клітин спричинюють дерегуляцію експресії генів дефенсинів, зокрема, гена *HD-6*.

I. L. Lisovsky, O. I. Khobta, M. A. Soldatkina, D. I. Litvin, N. V. Markeeva, L. L. Sidorik, P. V. Pogrebnoy

The expression of human defensin-6 (*HD-6*) gene in transformed human cell lines

Summary

The expression of human defensin-6 (*HD-6*) gene was studied in transformed human cell lines of different histogenesis: A431 (epidermoid carcinoma), CAM (T-cell lymphoma), Molt-4 (T-cell lymphoma), KB (epidermoid carcinoma), HeLa (epithelioid carcinoma), Colo 320HSR (adenocarcinoma), U251 (glioblastoma). *HD-6* gene expression was recorded by RT-PCR in all cell lines

mentioned above. These data indicate the possible dependence between the neoplastic transformation and deregulated expression of HD-6 gene.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Boman H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity // *Annu. Rev. Immunol.*—1995.—13.—P. 61—92.
- Diamond G., Jones D. E., Bevins C. L. Airway epithelial cells are the site of expression of a mammalian antimicrobial peptide gene // *Proc. Nat. Acad. Sci USA.*—1993.—90.—P. 4596—4600.
- Ganz T., Lehrer R. I. Antimicrobial peptides of vertebrates // *Curr. Opin. Immunol.*—1998.—10.—P. 41—45.
- Ganz T., Lehrer R. I. Defensins // *Curr. Opin. Immunol.*—1994.—64.—P. 584—593.
- Stolzenberg E. D., Anderson G. M., Ackermann M. R., Whitlock R. H., Zasloff M. Epithelial antibiotic induced in states of disease // *Proc. Nat. Acad. Sci USA.*—1997.—94.—P. 8686—8690.
- Diamond G., Russell J. P., Bevins C. L. Inducible expression of an antibiotic peptide gene in lipopolysaccharide-challenged tracheal epithelial cells // *Proc. Nat. Acad. Sci USA.*—1996.—93.—P. 5156—5160.
- Harder J., Bartels J., Christophers E., Schroder J. M. A peptide antibiotic from human skin // *Nature.*—1997.—387.—P. 861.
- Bensch K. W., Raida M., Magert H. J., Schulz-Knappe P., Forssmann W. G. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma // *FEBS Lett.*—1995.—368.—P. 331—335.
- Valore E. V., Park C. H., Quayle A. J., Wiles K. R., McCray P. B., Jr., Ganz T. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues // *J. Clin. Invest.*—1998.—101.—P. 1633—1642.
- McNamara N. A., Van R., Tuchin O. S., Fleiszig S. M. Ocular surface epithelia express mRNA for human beta defensin-2 // *Exp. Eye. Res.*—1999.—69.—P. 483—490.
- Wada A., Mori N., Oishi K., Hojo H., Nakahara Y., Hamanaka Y., Nagashima M., Sekine I., Ogushi K., Niidome T., Nagatake T., Moss J., Hirayama T. Induction of human beta-defensin-2 mRNA expression by *Helicobacter pylori* in human gastric cell line MKN45 cells on cag pathogenicity island // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1999.—263.—P. 770—774.
- Abiko Y., Mitamura J., Nishimura M., Muramatsu T., Inoue T., Shimono M., Kaku T. Pattern of expression of beta-defensins in oral squamous cell carcinoma // *Cancer Lett.*—1999.—143.—P. 37—43.
- Kagan B. L., Selsted M. E., Ganz T., Lehrer R. I. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1990.—87.—P. 210—214.
- White S. H., Wimley W. C., Selsted M. E. Structure, function, and membrane integration of defensins // *Curr. Opin. Struct. Biol.*—1995.—5.—P. 521—527.
- Hristova K., Selsted M. E., White S. H. Interactions of monomeric rabbit neutrophil defensins with bilayers: comparison with dimeric human defensin HNP-2 // *Biochemistry.*—1996.—10.—P. 11888—11894.
- Chertov O., Michiel D. F., Xu L., Wang J. M., Tani K., Murphy W. J., Longo D. L., Taub D. D., Oppenheim J. J. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils // *J. Biol. Chem.*—1996.—271.—P. 2935—2940.
- Lillard J. W., Jr., Boyaka P. N., Chertov O., Oppenheim J. J., McGhee J. R. Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1999.—96.—P. 651—656.
- Prohaszka Z., Nemet K., Csermely P., Hudecz F., Mezo G., Fust G. Defensins purified from human granulocytes bind C1q and activate the classical complement pathway like the transmembrane glycoprotein gp41 of HIV-1 // *Mol. Immunol.*—1997.—34.—P. 809—816.
- Liu L., Zhao C., Heng H. H. Q., Ganz T. The human beta-defensin-1 and alpha-defensins are encoded by adjacent genes: two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry // *Genomics.*—1997.—43.—P. 316—320.
- Maeda H., Akaike T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer // *Biochemistry (Mosc.)*—1998.—63.—P. 854—865.
- McKaig R. G., Baric R. S., Olshan A. F. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology // *Head. Neck.*—1998.—20.—P. 250—265.
- Poljak M., Cerar A., Seme K. Human papillomavirus infection in esophageal carcinomas: a study of 121 lesions using multiple broad-spectrum polymerase chain reactions and literature review // *Hum. Pathol.*—1998.—29.—P. 266—271.
- Sasaki H., Ishizuka T., Muto M., Nezu M., Nakanishi Y., Inagaki Y., Watanabe H., Watanabe H., Terada M. Presence of *Streptococcus anginosus* DNA in esophageal cancer, dysplasia of esophagus, and gastric cancer // *Cancer. Res.*—1998.—58.—P. 2991—2995.
- Tahara E. Molecular mechanism of human stomach carcinogenesis implicated in *Helicobacter pylori* infection // *Exp. Toxicol. Pathol.*—1998.—50.—P. 375—378.
- Погребной П. В., Серов С. М., Кленчин В. А., Лукьянов А. В., Гарманчук Л. В., Тарнавский Д. В., Маркеева Н. В., Быкорез А. И. Экспрессия гена трансформирующего фактора роста типа альфа, перенесенного рекомбинантным ретровирусным вектором в клетки A431 // *Молекуляр. биология.*—1993.—27.—С. 833—838.
- Погребной П. В., Hobta A. I., Soldatkina M. A., Garmanchouk L. V., Markeeva N. V., Eremenko T. A protein kinase inhibitor from A431 subline overexpressing TGF α possesses antimicrobial activity // *Microbiologica.*—1998.—21.—P. 269—273.
- Hanahan D., Weinberg R. The hallmarks of cancer // *Cell.*—2000.—100.—P. 57—70.
- Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Analyt. Biochem.*—1987.—162.—P. 156—159.
- Weinberg A., Krisanaprakornkit S., Dale B. A. Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications // *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*—1998.—9.—P. 399—414.
- Zhao C., Wang J., Lehrer R. I. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells // *FEBS Lett.*—1996.—396.—P. 319—322.
- Krisanaprakornkit S., Weinberg A., Perez C. N., Dale B. A. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue // *Infect. Immunol.*—1998.—66.—P. 4222—4228.
- Wilson C. L., Ouellette A. J., Satchell D. P., Ayabe T., Lopez-Boado Y. S., Stratman J. L., Hultgren S. J., Matrisian L. M., Parks W. C. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense // *Science.*—1999.—286.—P. 113—117.

УДК 666-006.04:575.117.2

Поступила в редакцию 16.12.98