

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

на правах рукописи

Кондратьева Лия Германовна
Роль регуляторных мастер генов в развитии рака поджелудочной железы

специальность – 03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ диссертации на соискание
учёной степени кандидата биологических наук

Москва 2020

Работа выполнена в лаборатории структуры и функций генов человека Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель:

Чернов Игорь Павлович, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории структуры и функций генов человека ИБХ РАН

Официальные оппоненты:

Прасолов Владимир Сергеевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, и.о. заведующего лабораторией клеточных основ развития злокачественных заболеваний Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук

Соболев Александр Сергеевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной генетики внутриклеточного транспорта Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук

Ведущая организация:

Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П. А. Герцена филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «24» июня 2020 года в 10:00 на заседании диссертационного совета Д002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте www.ibch.ru.

Автореферат разослан « » _____ года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

По данным ВОЗ в 2018 году в мире было зарегистрировано 17 миллионов новых случаев злокачественных новообразований и 9,6 миллионов случаев смерти от рака. Онкологические заболевания становятся причиной практически каждой шестой смерти в мире. В 2017 г. в России впервые выявлено почти 541 тыс. онкобольных (более 617 тыс. новых опухолей), умерло от злокачественных новообразований 290,7 тыс. больных, что составляет 15,9% в общей структуре смертности, это вторая причина после сердечно-сосудистых заболеваний.

Одним из наиболее трудно поддающихся лечению видов злокачественных новообразований является рак поджелудочной железы. В 2018 году в мире было зарегистрировано почти 460 тысяч новых случаев этого заболевания, в России за это время было выявлено около 15 тысяч новых больных. Около 90% всех случаев рака поджелудочной железы приходятся на экзокринную часть поджелудочной железы (ПЖ). Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы (ПАПЖ) – самое распространенное и наиболее агрессивное среди всех новообразований поджелудочной железы. Пятилетняя выживаемость пациентов с этим диагнозом составляет всего 5%. Самым опасным свойством рака ПЖ является раннее метастазирование, которое часто происходит до выявления первичной опухоли. Протоковая аденокарцинома ПЖ очень плохо поддается лечению традиционными химио- и радиотерапиями, а новейшие методы иммунотерапии, удостоенные Нобелевской премии в 2018 г. и успешно работающие на других видах рака, демонстрируют крайне низкую эффективность. Таким образом, сейчас проблема лечения рака ПЖ остается чрезвычайно актуальной и весьма далекой от решения.

Возникновение раковых клеток из нормальных предшественников представляет собой сложно регулируемый многоплановый процесс, в ходе которого осуществляются генетические, эпигенетические и клеточные изменения и происходит отбор наиболее приспособленных раковых клеток. Сравнение спектров экспрессии генов в опухолях и в клетках-предшественниках данной ткани показывают, что в опухолевых клетках происходит воспроизведение основных этапов развития клеток этого типа (рекапитуляция). Этот процесс может представлять собой общее характерное явление, указывающее на историю возникновения опухоли и на ее клеточный предшественник в организме. Существует предположение, что мастер регуляторные гены, кодирующие мастер регуляторы - факторы транскрипции, определяющие направление процессов развития, могут также играть ключевую роль в процессах канцерогенеза. Мастер регуляторы включают активацию множества других генов и образуют сложные многокомпонентные сети взаимодействия с другими факторами

транскрипции, которые играют ключевую роль в поддержании и амплификации клеток предшественников и определяют выбор дальнейшего пути дифференцировки.

Такая сеть ген-регуляторная сеть для транскрипционных факторов эмбрионального развития ПЖ мыши представлена на Рис. 1, пунктирами на схеме обозначены взаимодействия факторов. Среди них мы выделили потенциальные мастер регуляторные гены *PDX1*, *PTF1A*, *SOX9*, *GATA4* и *HNF1b*, активность которых имеет ключевое значение для развития поджелудочной железы и дисрегуляция которых играет принципиально важную роль при канцерогенезе ПЖ.

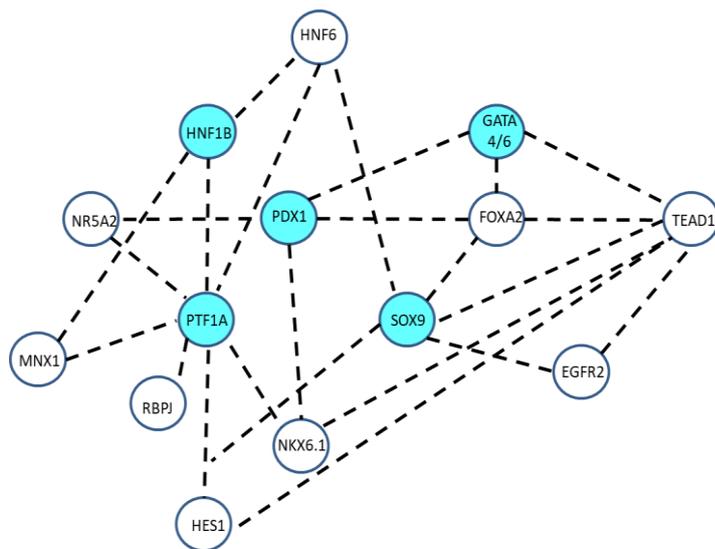


Рис.1. Сеть генных взаимодействий регуляторных факторов во время раннего эмбриогенеза поджелудочной железы. Пунктиром показаны случаи, как прямой регуляции, так и опосредованной. Голубым цветом выделены ключевые мастер гены, исследованные в работе.

Нарушение системы взаимодействий мастер регуляторных факторов влияет на возникновение и развитие различных патологических процессов, в том числе, и на развитие рака. Соответственно и гены, кодирующие мастер регуляторы, представляют существенный интерес, поскольку нарушение их регуляции приводит к изменениям баланса самих мастер регуляторов и, следовательно, к изменениям в системе их взаимодействий. В настоящее время большая часть информации о ключевых мастер регуляторах транскрипции получена на мышиных моделях, и не ясно насколько мышиная модель развития ПЖ и ПАПЖ адекватно отражает процессы, происходящие на транскрипционно-регуляторном уровне у человека. Поэтому идентификация роли ключевых мастер регуляторов развития в канцерогенезе ПЖ человека является актуальной проблемой. Полученные результаты позволяют углубить фундаментальные знания о механизмах эмбрионального развития ПЖ человека и прогрессии ПАПЖ, а также найти новые мишени для терапевтического воздействия на эту трудную для лечения опухоль.

Цель исследования: изучение регуляторных мастер генов развития поджелудочной железы *PTF1a*, *PDX1*, *SOX9*, *GATA4* и *HNFIb* в контексте развития протоковой аденокарциномы поджелудочной железы и их влияния на метастатический потенциал раковых клеток.

Задачи:

1. Сопоставление уровней экспрессии ключевых мастер генов эмбриогенеза ПЖ (*PTF1a*, *PDX1*, *SOX9*, *GATA4* и *HNFIb*) в образцах ПАПЖ, нормальной ПЖ и фетальной ПЖ
2. Исследование роли мастер генов развития ПЖ в процессе эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) и процессе метастазирования ПАПЖ
 - 2.1. Характеристика эпителиальных и мезенхимальных свойств клеток линий рака поджелудочной железы и анализ экспрессии мастер генов развития поджелудочной железы и некоторых связанных с ними в регуляторную сеть генов транскрипционных факторов поджелудочной железы;
 - 2.2. Подбор клеточную модель для изучения эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), как премеастатического события канцерогенеза, и оценка на этой модели изменений в экспрессии мастер генов эмбрионального развития поджелудочной железы и генов эпителиальных и мезенхимальных маркеров;
 - 2.3. Создание культур клеток линий рака поджелудочной железы со стабильной экспрессией мастер регуляторного гена *PDX1* и исследование его влияния на экспрессию эпителиальных и мезенхимальных маркеров;
 - 2.4. Изучение влияния экзогенной экспрессии гена *PDX1* на пролиферативный потенциал и подвижность клеток *in vitro* и *in vivo* на модели эмбрионов *Danio rerio*.

Научная новизна

В данной работе проведен экспериментальный анализ содержания продуктов экспрессии потенциальных мастер генов *SOX9*, *GATA4*, *PDX1*, *PTF1a*, *HNFIb* в опухолевых, нормальных и эмбриональных тканях поджелудочной железы, показана дифференциальная экспрессия этих генов в опухолевых и фетальных тканях поджелудочной железы. Для мастер генов *PDX1*, *PTF1a*, *SOX9*, *GATA4* был показан высокий относительный уровень экспрессии в образцах фетальной поджелудочной железы. В образцах ПАПЖ по сравнению с нормальной тканью обнаружена пониженная экспрессия *PTF1a* и примерно равная норме экспрессия *GATA4* и *HNFIb*. По уровню экспрессии гена *PDX1* выделили две группы опухолевых образцов – с пониженным уровнем и с соответствующим норме уровнем экспрессии, по уровню экспрессии *SOX9* опухолевые образцы имели 3 группы: с повышенным, пониженным и равным норме уровнем. Показанное для ряда опухолевых образцов одновременное подавление экспрессии нескольких мастер факторов может говорить о том, что, либо все эти факторы совместно

необходимы для поддержания клеточной идентичности предшественника опухолевых клеток, либо, что они образуют иерархический регуляторный модуль, высшую позицию в котором занимает один ген, потеря или снижение экспрессии которого вызывает соответствующую реакцию регулируемых им генов. Впервые обнаружена положительная корреляция уровней экспрессии генов *SOX9* и *PDX1*, а также *GATA4* и *PDX1* в образцах ПАПЖ. При этом подобной корреляции на уровне модельных клеточных линий не обнаружено.

Для исследования влияния экзогенной экспрессии гена *PDX1* на злокачественный потенциал раковых клеток были получены трансдуцированные клетки линий PANC-1 и ВхРС-3, экспрессирующие *PDX1* и контрольные клетки. Было показано, что при экзогенной экспрессии мастер регулятора *PDX1* в клетках линий рака ПЖ происходят изменения экспрессии генов маркеров эпителиально-мезенхимального перехода и эмбриональных транскрипционных факторов. При этом в более дифференцированных эпителиальных клетках линии ВхРС-3 влияние выражено в большей степени, что, возможно, связано с эпигенетическим состоянием регуляторов. Было обнаружено, что экспрессия гена *PDX1* увеличивает скорость роста клеток линии PANC-1 и ВхРС-3 по сравнению со скоростью роста контрольных клеток, и снижает в два раза миграцию клеток линии PANC-1 в тестах *in vitro*.

Было исследовано влияние экзогенной экспрессии гена *PDX1* на метастазирование раковых клеток в экспериментах по ксенотрансплантации в эмбрионах *Danio rerio* (совместно с ИМГ РАН). Впервые было показано, что экспрессия *PDX1* приводит к подавлению метастазирования.

Теоретическая и практическая значимость

Идентификация мастер регуляторных генов, определяющих появление клеток предшественников поджелудочной железы, которые инициируют процесс канцерогенеза, может открыть новые мишени для терапии протоковой аденокарциномы ПЖ.

Было выявлено, что уровни экспрессии генов в хирургических образцах не коррелируют с уровнями их экспрессии в культурах клеток рака ПЖ; для исследованных мастер генов не наблюдается зависимости от стадии прогрессии протоковой аденокарциномы ПЖ и не наблюдается ожидаемой рекапитуляции экспрессии эмбриональных генов в опухолях. Отсутствие рекапитуляции связано, по-видимому, с чрезвычайной гетерогенностью протоковой аденокарциномы ПЖ у разных пациентов.

С точки зрения потенциального терапевтического использования, важным результатом является наблюдение, что в значительной части исследованных образцов рака поджелудочной железы детектировалось пониженное содержание мРНК гена ключевого мастер регулятора развития поджелудочной железы – *PDX1*. Для проверки предположения о том, что ген *PDX1* может быть использован как антиметастатический агент в генно-терапевтических

конструкциях, были созданы клеточные линии рака ПЖ, экспрессирующие *PDX1*, и было изучено его влияние на пролиферативный потенциал, способность к миграции и экспрессию генов ЭМП. Выявленная нами способность *PDX1* подавлять миграционные свойства раковых клеток в тестах *in vitro* и на экспериментальных животных, позволяет предположить, что этот мастер регулятор имеет потенциал в качестве генно-терапевтического агента для ингибирования наиболее опасного свойства рака ПЖ – частого и раннего метастазирования.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты работы представлены на XXVIII Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2016), международной конференции «The European Human Genetics Conference 2016» (Барселона, 2016), Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные проблемы современной генетики» Казанского Федерального Университета (Казань, 2016), XXIX Зимней молодежной научной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 2017), 55-ой Международной научной студенческой конференции МНСК-2017 Новосибирского государственного университета (Новосибирск, 2017), Международном конгрессе «42nd FEBS Congress: From Molecules to Cells and Back» (Иерусалим, 2017), 22-ой Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» (Пушино, 2018), Международном саммите «29th Euro-Global Summit on Cancer Therapy&Radiation Oncology» (Рим, 2018), VI съезде биохимиков России (Сочи, 2019) и на научной конференции молодых ученых OPENBIO (Кольцово, 2019).

По результатам исследовательской работы опубликованы 9 статей в российских рецензируемых журналах из перечня ВАК РФ, 1 статья в зарубежном рецензируемом журнале и 11 тезисов докладов российских и международных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 110 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, целей и задач, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, благодарностей, списка использованной литературы, включающего 194 ссылки, списка сокращений и приложения. Диссертационная работа содержит 24 рисунка и 6 таблиц.

Основное содержание работы

1.1. Сопоставление уровней экспрессии ключевых мастер генов эмбриогенеза ПЖ в образцах ПАПЖ, нормальной ПЖ и фетальной ПЖ

На первом этапе работы был проведен сравнительный анализ экспрессии генов мастер регуляторов, координирующих эмбриональное развитие поджелудочной железы: *PDX1*, *PTF1a*, *SOX9*, *GATA4*, *HNF1b* (характеристика генов дана в Таблице 1) в образцах кДНК из опухолей поджелудочной железы, нормальной ПЖ, фетальной ПЖ.

Всего было исследовано 67 образцов тканей ПЖ, из них 39 образцов рака ПЖ (ПАПЖ) II—IV стадии; 12 образцов неизменной ткани ПЖ в качестве контрольной группы и 16 образцов фетальной ПЖ, полученных из абортного материала, соответствующего 12-24 неделям развития плода. Уровень экспрессии генов определяли в относительных единицах по сравнению с уровнем экспрессии референсных генов, которыми в исследовании являлись *EEF1a* и *18SPHK*. Статистическую обработку результатов исследования проводили в программе StatSoft Statistica 6.0 с использованием методов непараметрического анализа.

Таблица 1. Характеристика использованных в работе мастер генов развития ПЖ

Мастер ген развития ПЖ	Роль в эмбриогенезе ПЖ	Функция во взрослой ПЖ	Функционирование во время канцерогенеза ПЖ
PtF1a	Направляет дифференцировку клеток-предшественников ПЖ по эндо- и экзокринному пути	Транскрипционный регулятор экспрессии пищеварительных ферментов в ацинарных клетках	Потенциальный опухолевый супрессор. В предраковых состояниях и при ПАПЖ экспрессия на крайне низком уровне. При этом активированные вследствие травмы ацинарные клетки, коэкспрессирующие PtF1a, Sox9 и Hnf1b, могут быть подвергнуты ацинарно-протоковой метаплазии, лежащей в основе возникновения ПАПЖ.
PDX1	Направляет дифференцировку энтодермы по панкреатическому пути, а затем клеток-предшественников в бета-клетки островков Лангерганса	Поддержание и функционирование бета-клеток островков Лангерганса	Роль по мере опухолевой прогрессии меняется: сначала выступает в качестве опухолевого супрессора, сохраняя идентичность ацинарных клеток и препятствуя образованию панкреатической интраэпителиальной неоплазии (PanIN); после приобретения онкогенной Kras мутации PDX1 приобретает онкогенный потенциал, стимулируя пролиферацию клеток и ингибируя апоптоз; на поздних стадиях этот мастер ген снова выступает в роли онкосупрессора, подавляя эпителиально-мезенхимальный переход.
SOX9	Направляет дифференцировку энтодермы по панкреатическому пути, поддерживает клетки-предшественники, стимулируя пролиферацию и задерживая дифференцировку эмбриональных клеток	Поддержание гомеостаза экзокринной части ПЖ	Активированные вследствие травмы ацинарные клетки, коэкспрессирующие PtF1a, Sox9 и Hnf1b, могут быть подвергнуты ацинарно-протоковой метаплазии, лежащей в основе возникновения ПАПЖ. В зависимости «от контекста» может играть как роль опухолевого супрессора, так и онкогена.
GATA4	Транскрипционный регулятор факторов раннего развития ПЖ, а также необходим для нормальной пролиферации пула клеток-предшественников и созревания экзокринного компартмента ПЖ.	Поддержание фенотипа ацинарных клеток ПЖ	Может также выступать в роли онкогена посредством активации множества сигнальных путей, таких как MAPK, JAK-STAT, Hedgehog и Notch.
HNF1B	Запускает транскрипционный каскад HNF1B→HNF6→PDX1, направляющий дифференцировку энтодермы по пути ПЖ	Поддержание фенотипа протоковых клеток ПЖ	Потенциальный опухолевый супрессор. В предраковых состояниях и при ПАПЖ экспрессия на крайне низком уровне. При этом активированные вследствие травмы ацинарные клетки, коэкспрессирующие PtF1a, Sox9 и Hnf1b, могут быть подвергнуты ацинарно-протоковой метаплазии, лежащей в основе возникновения ПАПЖ.

что значения уровней экспрессии генов *SOX9* и *PDX1* статистически взаимосвязаны с коэффициентом корреляции Спирмена 0,7 ($p < 10^{-5}$), значения уровней экспрессии генов *GATA4* и *PDX1* статистически взаимосвязаны с коэффициентом корреляции Спирмена 0,6 ($p < 10^{-5}$) (Рис. 2Б). Корреляцию между уровнями *SOX9* и *PDX1*, и *GATA4* и *PDX1* и степенью дифференцированности раковых клеток выявить не удалось.

Мы закладывали гипотезу о рекапитуляции в случае ПАПЖ в основу идентификации ключевых генов, регулирующих канцерогенез. Однако сопоставление экспрессии ключевых генов в опухолях пациентов с их экспрессией в фетальных образцах показывает, что однозначной рекапитуляции в случае ПАПЖ не происходит. Вероятнее всего, это связано с различным происхождением ПАПЖ, ее чрезвычайной гетерогенностью, обильным и разнородным стромальным компонентом опухолей, клетки которого взаимодействует с раковыми клетками и влияют на свойства опухоли. Из данных литературы известно, что рекапитуляция может наблюдаться в опухолях, имеющих происхождение от одной общей стволовой клетки и образовавшей впоследствии множество гетерогенных клонов. Известно, что для ПАПЖ опухоли у разных пациентов, будучи фенотипически одинаковыми, могут происходить от разных предшественников. Гетерогенность в экспрессии генов *PDX1* и *SOX9* может быть связана с тем, что онкогенная либо онкосупрессорная роли обоих этих мастер генов определяются контекстом развития опухоли. Вследствие этого использовать мастер гены *PDX1* и *SOX9* в качестве диагностических биомаркеров ПАПЖ нельзя.

2. Исследование роли мастер генов развития ПЖ в процессе эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) и процессе метастазирования ПАПЖ

ПАПЖ является типичным примером, где раннее метастазирование является основной причиной смертности. Метастазирование представляет собой сложный процесс, большинство видов рака обладают присущими ему особенностями метастазирования. Точные события распространения раковых клеток с первичного участка, их миграция и последующее внедрение в отдаленные участки организма неизвестны. Эпителиально-мезенхимальный переход, как полагают, лежит в основе инвазии и метастазирования: клетки эпителиальной опухоли становятся подвижными и приобретают способность расселяться по разным участкам организма. Особенности экспрессии маркеров эпителиальных и мезенхимальных характеристик в раковых клетках могут быть связаны с их метастатическим потенциалом.

2.1. Характеристика экспрессии генов-маркёров эпителиального и мезенхимального состояния клеток, а также мастер генов развития поджелудочной железы и их продуктов в модельных клеточных линиях

На данном этапе исследований были подробно охарактеризованы спектры экспрессии генов, маркирующих эпителиальные и мезенхимальные характеристики, и генов

транскрипционных факторов поджелудочной железы. В качестве последних были выбраны исследованные нами ранее мастер гены *PTF1a*, *PDX1*, *SOX9*, *GATA4* и *HNFIb* и гены, связанные с ними в ген-регуляторную сеть. Для сравнения были использованы хорошо дифференцированные клеточные линии рака ПЖ ВхРС-3, Саран-2, соответствующие ранним стадиям развития рака ПЖ (Low grade), низкодифференцированные - MiaPaCa-2, PANC-1, соответствующие поздним стадиям развития рака ПЖ (High grade), и линия клеток промежуточного фенотипа AsPC-1. Анализ экспрессии позволил уточнить эпителиально-мезенхимальный статус клеток и оценить исходный относительный уровень экспрессии генов транскрипционных факторов ПЖ.

В качестве эпителиальных маркёров использовали гены *CDH1*, *KRT8* и *MUC1*. Также в группу «эпителиальных» генов был включен ген транскрипционного фактора *KLF5*, характерного преимущественно для эпителиальных клеток. В качестве мезенхимального маркёра был выбран ген *VIM*, а также гены транскрипционных факторов *SNAIL*, *SLUG* и *ZEB1*, которые по литературным данным активно экспрессируются в мезенхимальных клетках.

В клетках линий MiaPaCa-2 и PANC-1 было обнаружено сниженное содержание транскриптов генов эпителиальных маркеров *CDH1*, *KRT8*, *MUC1* и гена эпителиального транскрипционного фактора *KLF5* и повышенный уровень мРНК генов мезенхимальных транскрипционных регуляторов *ZEB1* и *SNAIL* и мезенхимального маркера виментина, что указывало на их мезенхимальный фенотип.

Напротив, для клеток самого эпителиального типа Саран-2 мы выявили повышенное содержание мРНК эпителиальных генов *CDH1*, *KRT8*, *MUC1* и *KLF5* и пониженное – мезенхимальных *VIM*, *SNAIL*, *ZEB1*.

В клетках линии ВхРС-3 был обнаружен относительно высокий уровень экспрессии эпителиальных генов *CDH1* и *KLF5* и гена мезенхимального транскрипционного фактора *SLUG* и пониженное содержание транскриптов мезенхимальных генов *VIM*, *SNAIL*, *ZEB1* и эпителиальных *KRT8* и *MUC1*. Таким образом, была показана их преимущественно эпителиальная принадлежность.

В то же время, по содержанию использованных нами маркёров клетки линии AsPC-1 оказалось невозможным однозначно отнести к одному из указанных выше типов: мы обнаружили в них высокое содержание мРНК генов *ZEB1*, *SLUG* и *VIM*, характерное для мезенхимальных клеток, и одновременно высокое содержание *KRT8* и *KLF5*, характерное для клеток эпителиального типа.

При исследовании экспрессии мастер генов ПЖ и связанных с ними в ген-регуляторную сеть транскрипционных факторов специфичных для ПЖ было показано, что в изученных клеточных линиях отсутствует или находится на очень низком уровне экспрессия генов *PDX1* и

PTF1A, определяющих дифференцированный фенотип зрелых эндокринных и ацинарных клеток ПЖ. Для генов *HNF1b*, *HES1*, *NKX6.1* показан повышенный уровень экспрессии в линии Саран-2 относительно других исследованных линий. Во всех пяти линиях рака ПЖ был детектирован примерно одинаковый уровень экспрессии гена *GATA6*. Уровень экспрессии гена *GATA4* повышен в мезенхимальных линиях MiaPaCa-2, PANC-1 и AsPC-1 и понижен в эпителиальных ВхРС-3 и Саран-2. Уровень экспрессии гена *SOX9* в линиях от наименее дифференцированной MiaPaCa-2 к дифференцированной ВхРС-3 снижается, за исключением линии Саран-2, в которой обнаружен высокий уровень.

2.2. Влияние индуцированного TGFβ1 эпителиально-мезенхимального перехода на экспрессию мастер генов в клетках рака поджелудочной железы

Одним из основных индукторов ЭМП при моделировании процесса канцерогенеза является трансформирующий ростовой фактор бета (TGFβ). Кроме того, TGFβ-индуцированный ЭМП характерен для процессов эмбрионального развития, и мастер гены развития ПЖ могут быть вовлечены в его регуляцию. Для исследования возможной роли транскрипционных факторов, координирующих эмбриональное развитие ПЖ в эпителиально-мезенхимальном переходе, мы проводили индукцию клеток линии PANC-1 с помощью TGFβ1 в течение 120 часов. Клеточная линия PANC-1 характеризуется мутациями в генах *KRAS*, *INK4A*, *INK4B* присутствующими в большинстве видов рака поджелудочной железы, и, что существенно для этой части работы, содержит немутантный рецептор TGFβRI и, в отличие от большинства других клеточных линий ПАПЖ, – функционирующий SMAD-комплекс. Таким образом, эта линия может быть использована в качестве модели событий, происходящих на преметастатических стадиях эволюции ПАПЖ.

Через 120 часов культивирования клеток линии PANC-1 в среде, содержащей TGFβ1, наблюдали изменение морфологии клеток: приобретение ими фибробластоподобной формы, характерной для мезенхимальных клеток, потерю межклеточных контактов и обособления их друг от друга, что может свидетельствовать о вступлении клеток в процесс эпителиально-мезенхимального перехода. Вестерн блот анализ показал значительное увеличение количества белка SNAIL и существенное снижение экспрессии E-кадгерина. Белок SNAIL является транскрипционным репрессором E-кадгерина, повышение его содержания и потеря экспрессии белка межклеточных контактов E-кадгерина – одни из наиболее ключевых событий ЭМП.

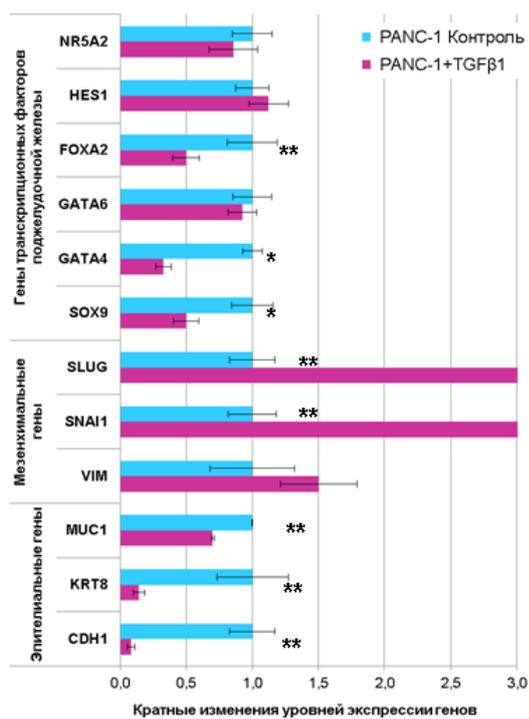


Рис. 3. Кратные изменения уровней экспрессии генов-маркеров ЭМП и мастер генов развития поджелудочной железы при индукции клеток линии PANC-1 фактором TGFβ1. N=3-5, * - p<0,05, ** - p<0,01

соответственно, и значительное снижение экспрессии «эпителиальных» генов: гена белка межклеточных контактов E-кадгерина (*CDH1*) и белка цитоскелета цитокератина 8 (*KRT8*) – в 13 и 7 раз соответственно, что подтверждает прохождение ЭМП в эксперименте.

Для 13 генов транскрипционных факторов развития ПЖ показано: отсутствие экспрессии или крайне низкий уровень экспрессии генов *PTF1A*, *PDX1*, *NEUROG3*, *RPBJL*, *NKX6.1* и *ONECUT1*, добавление фактора TGFβ1 в среду не стимулировало их экспрессию; неизменность экспрессии генов *HES1*, *NR5A2*, *GATA6* до и после инкубации клеток с TGFβ1, снижение уровня экспрессии генов *SOX9*, *FOXA2* в 2 раза и *GATA4* в 3 раза при индукции эпителиально-мезенхимального перехода TGFβ1.

Полученные данные не противоречат гипотезе о том что клетки PANC-1 предрасположены к эпителиально-мезенхимальному переходу, который ускоряется в присутствии фактора TGFβ1. Можно предполагать, что *in vivo*, где этот фактор присутствует, эти клетки будут предрасположены к образованию метастазирующих опухолей.

Для количественной оценки изменений уровня экспрессии генов, маркирующих ЭМП, и генов, координирующих эмбриональное развитие поджелудочной железы, была проведена ОТ-ПЦР в реальном времени. Относительный уровень транскрипции выбранных генов определяли относительно *18SPHK* и гена *EEF1a*. В качестве критерия запуска ЭМП нами использовались 4 гена: *SNAI1*, *SNAI2*, *CDH1* и *KRT8*, а в качестве критерия влияния ЭМП на состояние ключевых факторов эмбрионального развития ПЖ - изменения уровней экспрессии 13 генов: *PDX1*, *PTF1A*, *SOX9*, *GATA4*, *GATA6*, *FOXA2*, *HNFB1b*, *NEUROG3*, *HES1*, *ONECUT1*, *NKX6.1*, *NR5A2*, *RPBJL*. На рисунке 3 приведены результаты анализа относительного уровня экспрессии этих генов.

Для клеток, стимулированных TGFβ1, было показано увеличение экспрессии генов индукторов ЭМП *SNAI1* и *SNAI2* (*SLUG*) в 6 и 13 раз

2.3. Исследование влияния экспрессии PDX1 на метастатический потенциал культур клеток линий PANC-1 и клеток VхРС-3 in vitro

В ходе исследования экспрессии мастер генов развития поджелудочной железы в опухолевых образцах нами было сделано наблюдение, что в более чем половине исследованных образцов рака ПЖ, наблюдается пониженное содержание ключевого мастер регулятора развития ПЖ – PDX1. При этом из данных литературы известно, что самые плохие прогнозы имеют пациенты с очень низким уровнем этого регулятора в опухоли. PDX1 на преметастатических стадиях опухоли является ингибитором ЭМП. Поэтому было сделано предположение, что из исследуемых нами мастер генов, именно *PDX1* имеет потенциал в качестве генно-терапевтического агента. Его доставка и последующая экспрессия в клетках рака ПЖ может ингибировать наиболее опасную стадию ПАПЖ – метастазирование.

Для проверки гипотезы о возможном противометастатическом действии PDX1 мы исследовали влияние экзогенной экспрессии гена *PDX1* в клетках линий рака ПЖ человека PANC-1 и VхРС-3, для которых характерно отсутствие экспрессии эндогенного PDX1.

Клетки линии PANC-1 соответствуют высокой стадии (High grade) развития опухоли, сильно отличаются от нормальных клеток - низкодифференцированы, чаще всего обладают высокой скоростью роста и с большей вероятностью способны к распространению. Клетки линии VхРС-3 представляют менее развитые (Low grade) опухоли ПЖ, клетки которых хорошо дифференцированы, растут медленно и менее склонны к миграциям.

Клетки этих линий заражали лентивирусами, содержащий ген устойчивости к пурамицину и кодирующую часть гена *PDX1* под контролем PCNA промотора (Рис. 4А) или вектор несущий только ген устойчивости. После заражения вирусными частицами и последующей селекции в среде с пурамицином были получены культуры этих клеток, экзогенно экспрессирующие ген PDX1 (PANC-1^{PDX1} и VхРС-3^{PDX1}). В качестве контрольных клеток использовали клетки PANC-1 и VхРС-3, трансдуцированные лентивирусом, не содержащим ген *PDX1* (PANC-1^{Контроль} и VхРС-3^{Контроль}). Интеграцию вируса в геномную ДНК клеток оценивали с помощью ПЦР-анализа. Далее проводили определение уровней экспрессии гена *PDX1* в полученных клетках с помощью количественного ПЦР в реальном времени и анализировали уровень продукции белка при помощи вестерн блоттинга (Рис. 4Б и В). В клетках PANC-1^{PDX1} и VхРС-3^{PDX1}, содержащих кассету PCNA-PDX1, показано увеличение уровня транскрипции гена *PDX1* в 8 и 54 раза, соответственно, по сравнению с клетками PANC-1^{Контроль} и VхРС-3^{Контроль}, не содержащими кассету. Показано также повышение уровня синтеза белка PDX1 в клетках PANC-1^{PDX1} и VхРС-3^{PDX1} по сравнению с контрольными клетками.

Изменения активности ключевых регуляторов клеточной дифференцировки всегда сопровождаются значительными изменениями уровней экспрессии целых блоков генов,

задействованных в регуляции многих клеточных систем. Для выяснения, какие регуляторные системы могут быть связаны с влиянием PDX1 на фенотип клеток рака ПЖ, были выбраны гены, маркирующие эпителиальные (*KRT8*, *MUC1*, *CDH1*, *KLF5*), мезенхимальные (*VIM*, *SNAI1*, *SLUG*, *ZEB1*), экзокринные (*RBPJL*, *NR5A2*, *HES1*, *AMY2*, *CELA2*) и эндокринные (*ISL1*, *NEUROG3*, *NKX6.1*, *ONECUT1*, *INS1*, *GCG1*) клеточные фенотипы, а также мастер гены развития поджелудочной железы (*PDX1*, *PTF1a*, *SOX9*, *FOXA2*, *GATA4*, *GATA6*, *HNFI1b*). Экспрессию генов анализировали с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени.

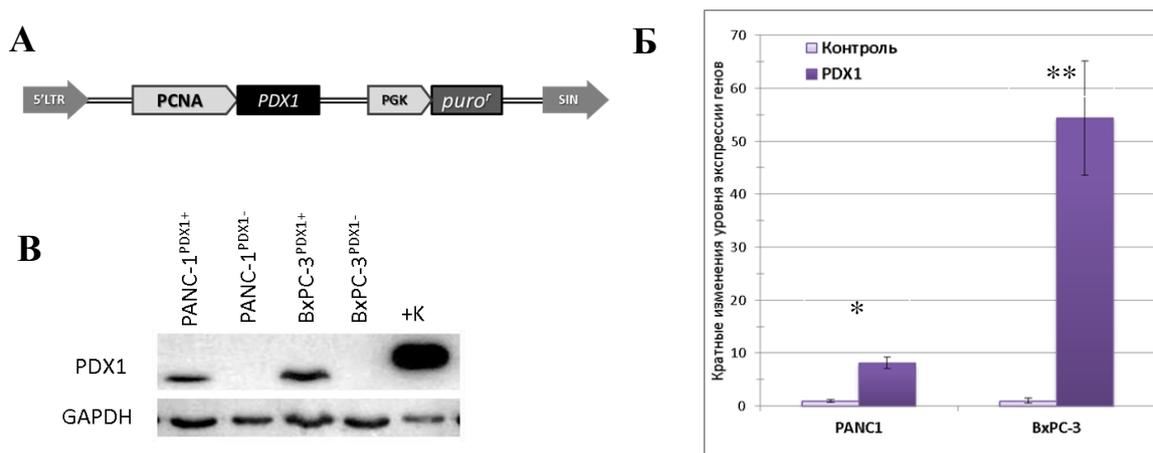


Рис.4. А. Схематическое изображение полученной в работе лентивирусной конструкции для экспрессии гена PDX1. Б. Кратные изменения уровня экспрессии гена *PDX1* в клетках PANC-1^{PDX1} и VxPC-3^{PDX1} относительно контрольных клеток. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$. В. Уровни синтеза белка PDX1 в клетках PDX1-экспрессирующих и контрольных культур PANC-1 и VxPC-3. Уровни синтеза белка GAPDH использовали для контроля общего количества белка, нанесенного на дорожки.

Экспрессия гена *PDX1* в клетках PANC-1^{PDX1} и VxPC-3^{PDX1} не приводила к активации экспрессии мастер регуляторных генов *PTF1a* и *HNFI1b*, эндокринных генов *ISL1*, *ONECUT1*, *INS1*, *GCG1* и *NEUROG3* и экзокринных генов *RBPJL*, *AMY2* и *CELA2*. В клетках PANC-1^{PDX1} по сравнению с контрольными клетками происходит увеличение экспрессии гена экзокринной принадлежности *HES1* в два раза, снижение экспрессии *ZEB1* в три раза и тенденция к повышению экспрессии *KRT8* и *MUC1*, *VIM*, *SLUG* – в 1,5 раз (Рис. 5А).

Полученные результаты показывают, что в клетках линии VxPC-3^{PDX1} по сравнению с контрольными клетками происходит увеличение экспрессии генов: *GATA4* – в 4 раза, *NR5A2* – в 2 раза, *KLF5* – в 2 раза, *ZEB1* – в 2,5 раза, а также снижение экспрессии генов *MUC1* и *SLUG* в 5 и 2 раза, соответственно (Рис. 5Б).

Опухолевая трансформация клеток сопряжена с характерными изменениями их биологических свойств. Прежде всего, это нарушение контроля клеточного цикла, которое выражается в усилении пролиферативной активности и скорости роста клеточных культур. Для того чтобы выявить возможное влияние экзогенной экспрессии PDX1 в клеточных культурах РПЖ на пролиферацию клеток, мы исследовали распределение клеток PANC-1 и VxPC-3,

экспрессирующих *PDX1* и контрольных, по стадиям клеточного цикла. Принадлежность клеток к фазам определяли по количеству ДНК методом проточной цитофлуориметрии с использованием иодида пропидия.

Было показано, что культуры трансдуцированных клеток, содержащих экспрессионные кассеты, отличаются от контрольных культур клеток по распределению по фазам клеточного цикла. Выявлено сокращение доли клеток PANC-1, экспрессирующих ген *PDX1*, находящихся в S-фазе до 45% по сравнению с 62% контрольных клеток в S-фазе. Сокращение доли клеток в S-фазе происходит за счет увеличения доли клеток в G1-фазе: в контроле им соответствует 34%, в клетках, содержащих экспрессионную кассету 43%, и в G2 в контроле – 6%, в клетках PANC-1^{PDX1} 12%.

Для клеток ВхРС3, экспрессирующих ген *PDX1*, также наблюдалось сокращение доли клеток в S-фазе до 43% по сравнению с 61% в контроле. Кроме того, в клетках ВхРС-3, экспрессирующих ген *PDX1*, происходит увеличения числа клеток, находящихся в G2 фазе: с 18% до 29%, и в G1 с 26% до 34%.

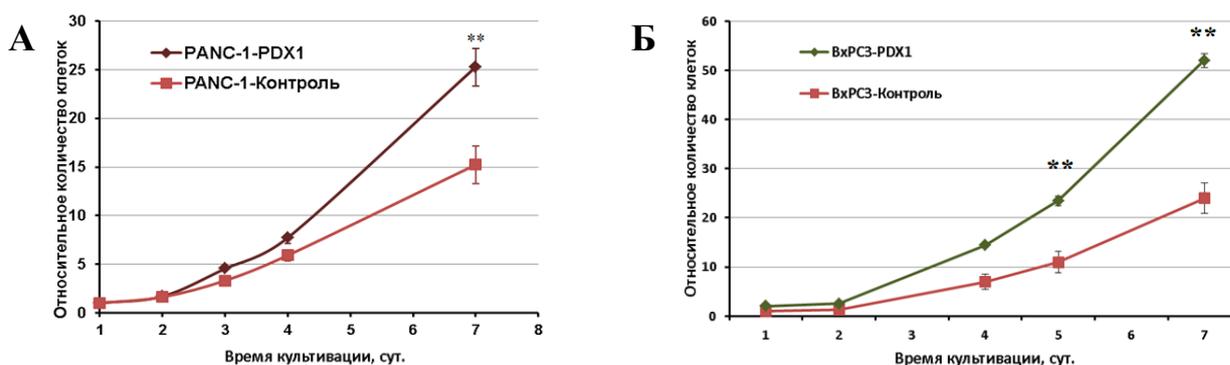


Рис. 6. А. Кинетика роста PDX1-экспрессирующих клеток линии PANC-1 и контрольных клеток PANC-1. Б. Кинетика роста PDX1-экспрессирующих клеток линии ВхРС-3 и контрольных клеток ВхРС-3. Данные нормированы относительно значений оптической плотности культур в первый день эксперимента. *- $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$.

Возможное влияние экзогенной экспрессии PDX1 на пролиферацию клеток линий PANC-1 и ВхРС-3 исследовали в анализе кинетики роста культур при помощи MTS-теста. На Рис. 6Б. приведены результаты определения относительного прироста клеток PDX1-экспрессирующих и контрольных культур PANC-1 и ВхРС3. Полученные данные показывают, что экспрессия гена *PDX1* в клетках линий рака ПЖ PANC-1 и ВхРС-3 увеличивает скорость роста в 1,7 раз и 2,3 раза соответственно к седьмому дню культивации.

К важнейшим изменениям, сопровождающим опухолевую прогрессию, относят приобретение клетками подвижности, способности к распространению по организму и, как следствие, возможность метастазирования. Поэтому на следующем этапе работы проводили

исследование влияния экзогенной экспрессии PDX1 на миграционный потенциал клеток рака ПЖ.

Линия ВхРС-3 является линией, которая образует монослойные островки с ярко выраженной эпителиальной морфологией и не дает метастазы. Предварительные эксперименты по изучению подвижности показали, что клетки этой линии обладают слабой миграционной активностью, поэтому из экспериментов по изучению влияния фактора PDX1 на подвижность клеток эта линия была исключена, и в последующих экспериментах изучали миграционный потенциал только клеток PANC-1, содержащих экспрессионную кассету PCNA-PDX1.

Для визуализации миграционного анализа и дальнейших экспериментов *in vivo* клетки PANC-1^{Control} и PANC-1^{PDX1} были трансдуцированы вирусом, содержащим ген GFP, и при помощи проточного цитофлуориметра были отобраны клетки с удобно тестируемыми значениями флуоресценции GFP. После сортировки был проведен вестерн блот анализ лизатов клеток, подтвердивший присутствие белка PDX1 в клетках PANC-1^{PDX1}.

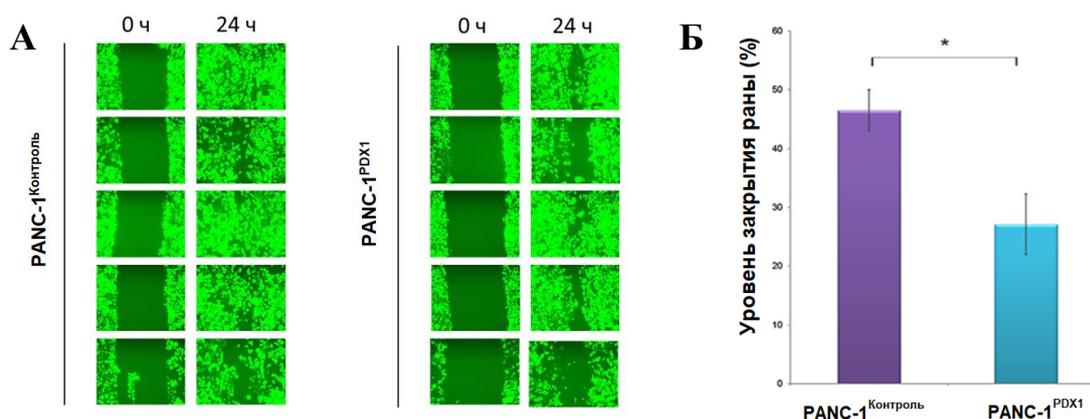


Рис. 7. А. Модель «раневого повреждения». Области раны на монослой клеток PANC-1^{Control} и PANC-1^{PDX1} сразу после нанесения царапины (0ч) и спустя 24 ч. Представлены 5 выборочных фото из 5 независимых экспериментов. Б. Процент «закрытия» клетками PANC-1^{Control} (N=12) и PANC-1^{PDX1} (N=10) области царапины через 24 часа относительно «начального состояния» в момент нанесения «царапины». * - p<0,05

Влияние фактора PDX1 на миграцию, оценивали на модели механического повреждения или «раневого повреждения» монослойных культур PANC-1^{Control} и PANC-1^{PDX1} в течение 24 часов. После нанесения царапины на монослой клеток, области раны фотографировали с помощью цифрового флуоресцентного микроскопа ZOE. Спустя 24 часа наблюдали, степень миграции клеток в область повреждения, и делали повторные снимки областей повреждения в тех же местах, для которых были получены микрофотографии сразу после нанесения царапины. На Рис. 7. представлены динамика закрытия царапин (А) и процент «зарастания» раны (Б), который рассчитывался помощью программы ImageJ. Анализировали количество занятого клетками PANC-1^{Control} и PANC-1^{PDX1} места в областях царапины в момент нанесения и спустя

24 часа. По сравнению с контрольными клетками «зарастание» раны клетками PANC-1, экспрессирующими PDX1, было замедлено примерно в 2 раза.

Для анализа миграционной способности клеток PANC-1, экспрессирующих PDX1, проводили анализ миграции с помощью системы TransWell для 6-луночных планшетов с диаметром пор 8 мкм. Клеточную суспензию в среде с низкой концентрацией сыворотки помещали в верхнюю часть системы TransWell, в нижнюю часть вносили среду, содержащую стандартную концентрацию сыворотки 10%. Планшеты помещали в CO²-инкубатор на 24 часа, после чего удаляли клетки с верхней стороны мембраны вставки TransWell и анализировали количество мигрировавших клеток на нижней стороне мембраны вставки TransWell с помощью флуоресцентного микроскопа ZOE. Анализ миграции клеток через систему TransWell показал, что число мигрировавших клеток, экспрессирующих PDX1, было в 2 раза меньше, чем контрольных клеток (Рис. 8 А и Б).

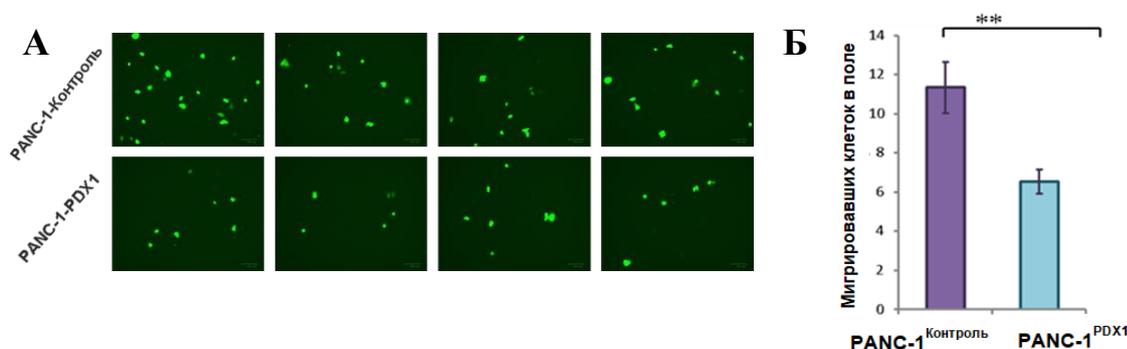


Рис. 8. А. Мигрировавшие клетки PANC-1^{Контроль} и PANC-1^{PDX1} на нижней стороне мембраны вставки TransWell. Представлены 4 выборочных фото из 5 независимых экспериментов. Б. Количество мигрировавших клеток в поле флуоресцентного микроскопа усредненное по 15 изображениям для PANC-1^{Контроль} и PANC-1^{PDX1}.

** - $p < 0,01$

2.4. Исследование влияния экспрессии PDX1 на метастатический потенциал клеток линий PANC1 *in vivo*

В качестве контроля для экспериментов *in vivo* использовали систему подавления экспрессии гена PDX1 с помощью малых интерферирующих РНК, комплементарных мРНК гена PDX1 (siPDX1) в условиях транзientной трансфекции. Связывание siPDX1 с молекулой мРНК PDX1 приводит к разрушению или деаденилированию мРНК, либо предотвращает трансляцию мРНК рибосомами, что в итоге приводит к подавлению экспрессии PDX. В работе было использовано в комплексе 3 различных последовательности малых интерферирующих РНК, комплементарных мРНК гена PDX1 и отличающихся участками связывания с молекулой мРНК PDX1, а также контрольную scramble последовательность, которая не имеет участков комплементарных к геномной ДНК человека (siNeg). Эффективность подавления экспрессии

PDX1 в культурах PANC-1^{Контроль} и PANC-1^{PDX1}, оценивали методом иммуноблоттинга со специфическими антителами к белку PDX1 (Рис. 9А).

Для оценки функционального эффекта экзогенной экспрессии PDX1 на клетки PANC-1 *in vivo* в качестве модели мы использовали эмбрионы *Danio rerio*, (zebrafish). Иммунная система эмбрионов в течение первой недели еще недостаточно сформирована для отторжения ксенографтных клеток. Поэтому имплантация опухолевых клеток человека в ходе коротких экспериментов не требует специальных усилий для угнетения иммунитета. Эксперименты *in vivo* проводили совместно с лабораторией белковой инженерии Института молекулярной генетики РАН.

Флуоресцентно меченные GFP нетрансфицированные клетки PANC-1^{Контроль} и PANC-1^{PDX1}, а также клетки, обработанные siNeg и siPDX1, вводили в область желточного мешка двухдневным эмбрионам *Danio rerio* и спустя 24 и 48 часов после инъекции с помощью микроскопии анализировали распределение клеток по организмам (Рис. 9Б). Результаты анализа влияния эктопической экспрессии гена *PDX1* в клетках PANC-1 на метастатический потенциал представлены в Таблице 2.

Клетки	PANC-1 ^{Контроль}			PANC-1 ^{PDX1}		
	Без siRNA	siPDX1	siNeg	Без siRNA	siNeg	siPDX1
% эмбрионов с миграцией	50%	30%	23%	12,5%	6%	40%

Таблица 2. Результаты анализа влияния экзогенной экспрессии гена *PDX1* в клетках PANC1 на метастатический потенциал. Представлены результаты 8 независимых экспериментов, разница между экспериментами составляла не более 10%.

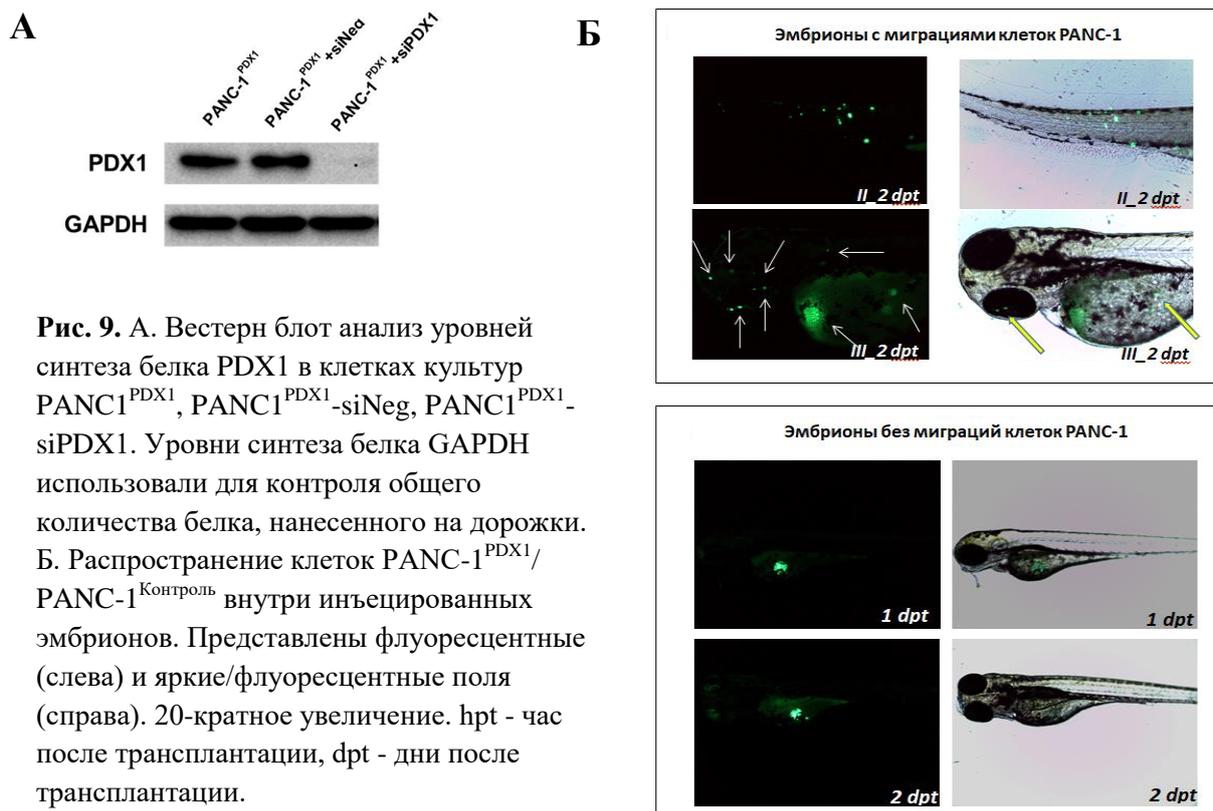


Рис. 9. А. Вестерн блот анализ уровней синтеза белка PDX1 в клетках культур PANC1^{PDX1}, PANC1^{PDX1}-siNeg, PANC1^{PDX1}-siPDX1. Уровни синтеза белка GAPDH использовали для контроля общего количества белка, нанесенного на дорожки. Б. Распространение клеток PANC-1^{PDX1}/PANC-1^{Контроль} внутри инъекцированных эмбрионов. Представлены флуоресцентные (слева) и яркие/флуоресцентные поля (справа). 20-кратное увеличение. hpt - час после трансплантации, dpt - дни после трансплантации.

Как видно из Таблицы 2, клетки PANC-1^{PDX1}, инъекцированные эмбрионам *Danio rerio*, через 2 суток после трансплантации демонстрировали более низкий уровень миграции (12,5%) по сравнению с контрольными клетками, распространявшимися по организмам рыб в 50% случаев. При этом миграция инъекцированных клеток PANC-1^{PDX1}-siPDX1, была на более высоком уровне (в 40%) по сравнению с миграцией клеток PANC 1^{PDX1}-siNeg (в 6%). Это свидетельствует о том, что экспрессия гена *PDX1* в клетках рака поджелудочной железы подавляет миграционную способность клеток не только *in vitro*, но и *in vivo*.

Заключение

Данное исследование проводилось по двум взаимосвязанным направлениям: 1. Исследование экспрессии ключевых факторов эмбриогенеза ПЖ при раке ПЖ и в фетальной ПЖ; 2. Исследование роли мастер генов развития ПЖ в процессе ЭМП и процессе метастазирования ПАПЖ. В рамках первого направления нами проведено систематическое исследование экспрессии мастер генов развития ПЖ в хирургических образцах рака ПЖ и фетальном материале. Вопреки ожиданиям мы обнаружили отсутствие рекапитуляции экспрессии выбранных эмбриональных мастер генов при раке ПЖ. Это находится в противоречии с ранее полученными нами и другими авторами данными по рекапитуляции в таких опухолях, как рак легкого и пищевода. Отсутствие рекапитуляции в раке ПЖ, по-видимому, связано с тем, что, как было недавно показано другими группами исследователей, протоковая аденокарцинома ПЖ может представлять многочисленные болезни с одинаковым

фенотипом. В данном исследовании нами впервые была показана корреляция между значениями экспрессии пар генов *PDX1* и *SOX9*, *PDX1* и *GATA4* в опухолевых образцах. Мы также обратили внимание, что в большинстве хирургических образцов понижено содержание одного из ключевых факторов эмбрионального развития – мастер регулятора *PDX1*. При этом из данных литературы известно, что самые плохие прогнозы имеют пациенты с низким уровнем экспрессии этого регулятора в опухоли. Предполагалось, что мастер ген *PDX1* возможно на последних этапах развития рака ПЖ может быть ингибитором метастазирования. Таким образом, первое направление исследований выявило потенциальную возможность использования мастер регулятора эмбриогенеза ПЖ *PDX1* в качестве мишени противометастатического воздействия. Для проверки возможного антиметастатического потенциала *PDX1* следовало выбрать клеточную модель преметастатического состояния ПАПЖ. Такой моделью могла служить клеточная линия соответствующая высокой стадии (High grade) развития опухоли. По имеющимся данным такой линией может служить линия PANC-1. Она характеризуется мутациями в генах *KRAS*, *INK4A*, *INK4B* присутствующими в большинстве видов рака поджелудочной железы, и, что существенно для этой части работы, содержит немутированный рецептор TGFβRI и, в отличие от большинства других клеточных линий ПАПЖ, – функционирующий SMAD-комплекс. Таким образом, она может служить клеточной моделью клеток ПАПЖ на преметастатических стадиях эволюции опухоли.

Используя эту линию, мы исследовали влияние природного индуктора ЭМП – TGFβ на экспрессию факторов ЭМП в PANC-1 и обнаружили ожидаемую индукцию ЭМП, и было отмечено негативное влияние программы эпителиально-мезенхимального перехода, индуцированного TGFβ1, на экспрессию мастер генов развития поджелудочной железы *SOX9*, *GATA4*, *FOXA2*.

Это позволило выбрать линию PANC-1 для исследования роли *PDX1* в качестве антиметастатического агента. Для проверки такой возможности мы создали клеточные линии рака ПЖ, экспрессирующие ген *PDX1* на высоком уровне, и проанализировали «опухолевые» свойства полученных клеток в сравнении с контрольными клетками не экспрессирующими *PDX1*. Результаты, полученные в нашей работе, позволяют предположить, что *PDX1* действительно может блокировать способность раковых клеток к распространению. Этот вывод основан на следующих наблюдениях: 1. Скорость «заращения» раны в анализе механического повреждения монослойных культур была замедлена в клетках PANC-1, экспрессирующих *PDX1*, по сравнению с контрольными клетками. 2. Результаты анализа миграции через систему TransWell показали, что количество мигрировавших клеток PANC-1^{PDX1} было заметно меньше, чем у контрольных клеток. 3. В клетках PANC-1, экспрессирующих *PDX1*, наблюдается снижение экспрессии гена *ZEB1*, являющегося транскрипционным регулятором программы

эпителиально-мезенхимального перехода, и повышение экспрессии генов эпителиальных характеристик *MUC1*, *KRT8*, *CDH1*. 4. Значительное снижение миграции клеток PANC-1^{PDX1} по сравнению с контрольными клетками PANC-1 в экспериментах на модельных животных, подтвержденное тем фактом, что siRNA ингибирование PDX1 в клетках PANC-1^{PDX1} вызывает увеличение подвижности клеток. Эти результаты могут свидетельствовать о том, что ген *PDX1* и, возможно, играет роль в подавлении метастазирования.

Выводы

1. Для исследованных мастер генов эмбрионального развития поджелудочной железы (*PDX1*, *PTF1a*, *SOX9*, *GATA4* и *HNF1b*) обнаружено отсутствие рекапитуляции экспрессии в случае рака поджелудочной железы, в отличие от показанной ранее рекапитуляции мастер генов в других опухолях. Причиной наблюдаемого отличия может служить генетическая гетерогенность протоковой аденокарциномы поджелудочной железы.

2. Клеточная линия PANC-1 может быть использована в качестве модели премеастатического состояния протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, поскольку подвергается процессу эпителиально-мезенхимального перехода под воздействием фактора TGFβ1.

3. В процессе эпителиально-мезенхимального перехода, индуцированного воздействием TGFβ1, происходит снижение экспрессии эмбриональных мастер генов ПЖ *SOX9*, *GATA4*, *FOXA2* в клетках линии рака поджелудочной железы PANC-1.

4. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* впервые было выявлено, что экспрессия гена *PDX1* снижает миграционную активность раковых клеток и, возможно, играет роль в подавлении метастазирования.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. **Л. Г. Кондратьева**, Т. В. Виноградова, И. П. Чернов, Е. Д. Свердлов. Мастер регуляторы транскрипции, определяющие судьбу клеточных линий в развитии, как возможные терапевтические мишени в онкологии // Генетика. 2015. Т. 51. № 11, с. 1221–1233
2. **Л. Г. Кондратьева**, А. А. Свешникова, Е. В. Гранкина, И. П. Чернов, М. Р. Копанцева, Е. П. Копанцев, Е. Д. Свердлов. Подавление экспрессии генов SOX9, FOXA2 и GATA4 в клетках рака поджелудочной железы при индукции эпителиально-мезенхимального перехода под действием TGFB1 // Доклады Академии Наук. 2016. Т.469. № 2, с. 1–4
3. **М. В. Зиновьева**, М. Б. Костина, И. П. Чернов, Л. Г. Кондратьева, Е. Д. Свердлов. KLF5, новый игрок и новая мишень в постоянно меняющемся составе молекулярных двигателей рака поджелудочной железы // Биоорганическая Химия. 2016. Т. 42. № 6, с. 668–674
4. **Л.Г. Кондратьева**, Д.А. Дидыч, И.П. Чернов, Е.П. Копанцев, Е.А. Стукачева, Т.В. Виноградова, Е.Д. Свердлов. Зависимость экспрессии мастер регуляторных генов эмбрионального развития в клетках рака поджелудочной железы от внутриклеточной концентрации мастер регулятора PDX1 // Доклады Академии Наук. 2017. Т. 475. № 2, с. 217–221
5. T. V. Vinogradova, I. P. Chernov, G. S. Monastyrskaya, **L. G. Kondratyeva**, E. D. Sverdlov. Cancer Stem Cells: Plasticity Works against Therapy. Acta Naturae. 2015, 7(4): 46–55.
6. **Л. Г. Кондратьева**, И. П. Чернов, М. В. Зиновьева, Е. П. Копанцев, Е. Д. Свердлов. Экспрессия генов мастер-регуляторов эмбрионального развития в опухолях поджелудочной железы // Доклады Академии Наук. 2017. Т. 475. № 1, с. 99–102
7. **Л.Г. Кондратьева**, К.Н. Кашкин, И.П. Чернов, Е.А. Стукачева, Д.А. Дидыч, Е.П. Копанцев, Е.Д. Свердлов. PCNA: конститутивный промотор человека для экспрессии генов в целях их функционального и генно-терапевтического использования. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2017. Т.35. №3, с. 89-92
8. **Л.Г. Кондратьева**, И.П. Чернов, М.В. Зиновьева, В.И. Егоров, Е.П. Копанцев, Е. Д. Свердлов. Гетерогенность экспрессии мастер-регулятора эмбрионального развития SOX9 у больных раком поджелудочной железы // Доклады Академии Наук. 2018. Т. 481. №4, с. 1–4.
9. М.В. Зиновьева, Л.Г. Николаев, **Л.Г. Кондратьева**, Т.В. Виноградова, Е.Д. Свердлов. Корреляция экспрессии генов транскрипционных факторов *KLF5* И *ZEB1* при раке поджелудочной железы // Доклады Академии Наук. 2018. Т. 481. № 5, с. 567-569
10. **L.G. Kondratyeva**, D.R. Safina, I.P.Chernov, E.P. Kopantzev, S.V. Kostrov, E.D. Sverdlov. PDX1, a key factor in pancreatic embryogenesis, can exhibit antimetastatic activity in pancreatic ductal adenocarcinoma. // Cancer Management and Research. 2019. Т. 11. с. 7077-7087.

Тезисы докладов на конференциях

1. **Л.Г. Кондратьева**, А.А. Свешникова. Изучение экспрессии генов мастер-регуляторных транскрипционных факторов в клетках линии PANC-1, стимулированных TGFβ1 // XXVIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» – 8-11.02.16 – Москва. – Сборник тезисов, с.80
2. **L. Kondratyeva**, A. Sveshnikova, I. Chernov, E. Kopancev, E. Sverdlov. The pancreatic master genes expression in Panc1 cells stimulated with TGFβ1 // The European Human Genetics Conference – 20-24.05.16 – Barcelona, Spain – European Human Genetics Conference 2016 Abstracts, Cancer Genetics, p. 296
3. **Л.Г. Кондратьева**, И.П. Чернов, Е.П. Копанцев. Оценка влияния сверхэкспрессии гена PDX1 на клетки рака поджелудочной железы // Всероссийская конференция с международным участием «Актуальные проблемы современной генетики» Казанского Федерального Университета – 20-22.10.16 – Казань – Сборник тезисов, с. 59-61
4. **Л.Г. Кондратьева**, И.П. Чернов, Е.П. Копанцев, М.В. Зиновьева, Е.Д. Сverdlov. Экспрессия генов мастер регуляторов развития поджелудочной железы в опухолевых образцах // XXIX Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" – 7-10.02.17 – Москва – Сборник тезисов, с. 24
5. **Л.Г. Кондратьева**. Экспрессия мастер генов развития поджелудочной железы в образцах фетальной поджелудочной железы человека // 55-я Международная научная студенческая конференция МНСК-2017 – 16-20.04.2017 – Новосибирск – Сборник тезисов, с.129.
6. **L. Kondratyeva**, D. Didych, I. Chernov, E. Kopantzev, E. Stukacheva, T. Vinogradova, E. Sverdlov. Effect of overexpression of the pancreatic master gene PDX1 on the embryonic master genes expression in pancreatic cancer cells // 42nd FEBS Congress – 10-14.09.17 – Jerusalem, Israel – The FEBS Journal, V.284, Supplement: 42nd FEBS Congress, From Molecules to Cells and Back, pp.266-267
7. А.И. Тарасенко, **Л.Г. Кондратьева**. Экспрессия генов мастер регуляторов эмбрионального развития поджелудочной железы в клеточных линиях рака поджелудочной железы // 22-ая Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» – 23-27.04.18 – Пущино – Сборник тезисов, с. 160.
8. **LG Kondratyeva**, IP Chernov, EP Kopantzev, MV Zinovieva, ED Sverdlov. Correlation between the expression of embryonic master regulators SOX9 and PDX1 in pancreatic cancer samples // 29th Euro-Global Summit on Cancer Therapy&Radiation Oncology – 23-25.07.18 – Rome, Italy – Journal of Cancer Science&Therapy, V.10, p.95.

9. **Л.Г. Кондратьева**, И.П. Чернов, Е.Д. Свердлов. Ключевой фактор эмбрионального развития поджелудочной железы PDX1 снижает метастатический потенциал клеток рака поджелудочной железы *in vitro*. // II объединенный научный форум: VI съезд физиологов, VI съезд биохимиков, IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» – 1-6.10.19 – Дагомыс – Acta Naturae, спецвыпуск, Т.2, с.223
10. Д.Р. Сафина, **Л.Г. Кондратьева**, М.П. Рощина, Е.П. Копанцев, И.П. Чернов, С.В. Костров. Анализ вовлеченности мастер-гена PDX1 в миграцию раковых клеток человека на модели развивающегося эмбриона *Danio rerio*. // II объединенный научный форум: VI съезд физиологов, VI съезд биохимиков, IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» – 1-6.10.19 – Дагомыс – Acta Naturae, спецвыпуск, Т.2, с.217
11. **Л.Г. Кондратьева**, И.П. Чернов. Влияние эктопической экспрессии гена PDX1 на пролиферативный и миграционный потенциал клеток рака поджелудочной железы // VI международная конференция молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов OPENBIO – 22-25.10.19 – Научоград Кольцово – сборник тезисов, с. 532
12. **Л.Г. Кондратьева**, И.П. Чернов, Сафина Д.Р., Костров С.В., Свердлов Е.Д. Исследование роли гена PDX1 в прогрессии рака поджелудочной железы // XXXII зимняя молодежная научная школа «Перспективные Направления Физико-Химической Биологии И Биотехнологии» – 10-13.02.2020 – Москва – сборник тезисов, с. 15