

УДК 577.214.625

Опухолевая специфичность промоторов генов, участвующих в контроле клеточной пролиферации

К. Н. Кашкин*, И. П. Чернов, Е. А. Стукачева, Е. П. Копанцев, Г. С. Монастырская, Н. Я. Успенская, Е. Д. Свердлов

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: kachkine@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.02.2013

РЕФЕРАТ В представленной работе изучена опухолевая специфичность промоторов генов *CDC6*, *POLD1*, *CKS1B*, *MCM2*, *PLK1* человека. С этой целью промоторные области указанных генов, включающие кор-промотор и примыкающую (дистально по отношению к точке начала транскрипции) потенциальную регуляторную область, клонировали в вектор pGL3 перед репортерным геном люциферазы *Photinus pyralis*. Сравнили способность всех клонированных фрагментов ДНК направлять экспрессию гена люциферазы в серии опухолевых клеток и в нормальных фибробластах человека. Активность всех промоторов оказалась существенно выше в опухолевых клетках, чем в нормальных фибробластах. При этом специфичность промоторов в отношении опухолевых клеток снижалась в ряду *PLK1*, *CKS1B*, *POLD1*, *MCM2*, *CDC6*. Показано, что клонированный промотор гена *CKS1B* является двунаправленным и, по-видимому, направляет транскрипцию соседнего гена *SHC1*, ориентированного «голова к голове». Клонированные промоторы могут быть использованы для создания генно-инженерных противоопухолевых препаратов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА промотор, клонирование, опухолеспецифичность, генная терапия опухолей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ТНТ – точка начала транскрипции.

ВВЕДЕНИЕ

Среди актуальных направлений разработки противоопухолевых препаратов важное место занимает создание генно-инженерных векторов, экспрессирующих токсичные для опухолевых клеток продукты. Эти векторы должны содержать опухолеспецифичные регуляторные элементы, способные обеспечить экспрессию терапевтического гена в максимально возможном наборе опухолей и отсутствие его экспрессии в нормальных тканях. В настоящее время круг известных промоторов с такими свойствами ограничен.

В поиске новых опухолеспецифичных промоторов мы предположили, что опухолевой специфичностью могут обладать промоторы генов, участвующих в репликации ДНК, поскольку нарушение регуляции деления клеток считается общим свойством опухолей. Чтобы проверить правильность этой гипотезы, мы клонировали промоторы некоторых генов, вовлеченных в процессы синтеза ДНК и деления клетки, и оценили способность этих промоторов направлять экспрессию репортерного гена в нормальных и опухолевых клетках различного происхождения. Для клонирования мы выбрали промоторы генов *CDC6*, *POLD1*, *CKS1B*, *MCM2*, *PLK1*.

Продукт гена *CDC6* – гомолог белка *CDC6* *Saccharomyces cerevisiae*, необходимого для инициации репликации ДНК. *CDC6* служит регулятором ранних стадий репликации ДНК, а также участвует в контроле свертывочной точки (check-point), определяющей завершение репликации ДНК перед началом митоза. Нарушение регуляции экспрессии *CDC6* ассоциировано с высоким риском развития рака [1, 2]. Ген *POLD1* кодирует каталитическую субъединицу ДНК-полимеразы δ , участвующей в репликации и репарации геномной ДНК человека. Эта субъединица обладает полимеразной (синтез ДНК) и экзонуклеазной (в направлении 3'→5') активностями. Кроме того, *POLD1* участвует в достройке фрагментов Оказаки, иницируемых комплексом ДНК-полимеразы α /праймазы. У мышей, дефектных по экзонуклеазной функции ДНК-полимеразы δ , чаще развиваются спонтанные опухоли [3]. Белок *CKS1B* представляет собой компонент протеинкиназы *CDC28*, необходимый для эмбриогенеза и правильного чередования фаз цикла соматических клеток [4]. *CKS1B* образует комплекс с белком *CDC2* и регулирует транскрипцию гена *CDC20*. Взаимодействие *CKS1B* с комплексом *SKP2*–циклин E-p27^{KIP} обеспечивает убиквитиниро-

Праймеры, использованные для амплификации промоторов

Промотор	Праймер (5'→3')
<i>POLD1</i> (-1338; +66)*	GGTACCTGAATACAATCCAGCCCGGAG GGTACCCCTCTACTCACCCTTCAAAC
<i>CDC6</i> (-1539; +238)	GCTAGCGATCATGGCACGGCACTCA GCTAGCTCAGACCTCCAGCGAGTCA
<i>CKS1B</i> (-910; +106)	GGTACCGGTCCCACAAAGATAAAGCTCC GGTACCTATGATCGCTCGGTTTGCTAG
<i>MCM2</i> (-1949; +57)	ATCCGAGGTGCATCCTTCAC AGCAGTACCACGATCCTCTCC
<i>PLK1</i> (-2338; +35)	GCAAGACTCCATCTCAACAACA CAGACCTCGATCCGAGCAG

*Координаты промотора относительно точки начала транскрипции гена.

вание и деградацию p27 – блокатора клеток в фазе G0/G1 в ответ на различные сигналы и неблагоприятные воздействия, а также регулятора подвижности клеток и апоптоза [5]. Ген *CKS1B* расположен «голова к голове» с геном *SHC1* и, вероятно, использует общий с ним двунаправленный промотор [6]. Известно, что продукты гена *SHC1* регулируют передачу митогенных сигналов в клетке, участвуют в p53-зависимом апоптозе в условиях окислительного стресса и регуляции продолжительности жизни. Белок p66Shc играет важную роль в канцерогенезе и метастазировании опухолей [7]. Ген *MCM2* кодирует одну из субъединиц белкового комплекса MCM2-7, необходимого для инициации репликации ДНК, формирования репликативной вилки и привлечения других белков, участвующих в репликации ДНК. Взаимодействуя с другими белками инициаторного комплекса, MCM2 регулирует его хеликазную активность [8]. Промоторы генов *SHC1* и *MCM2* не охарактеризованы подробно. PLK1 (Polo-like kinase 1) – серин/треониновая протеинкиназа 1, выполняет несколько важнейших функций в ходе М-фазы клеточного цикла, включая регуляцию созревания centrosомы и сборки веретена деления, а также регуляцию завершения митоза и цитокинеза. Белок PLK1 необходим для восстановления клетки после повреждений ДНК и вхождения в митоз [9]. Перечисленные свойства шести генов и их повышенная экспрессия во многих опухолях человека (GeneHub GEPIs, [10]) позволяют надеяться, что выбранные промоторы будут обладать как опухолевой специфичностью, так и универсальностью в отношении опухолей, и смогут служить регуляторными элементами в составе противоопухолевых генно-инженерных конструкций.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Промоторы амплифицировали из геномной ДНК человека с помощью Tersus и Encyclo ДНК-полимераз («Евроген», Россия). Промоторы клонировали в указанных координатах по отношению к точке начала транскрипции (ТНТ) и с использованием праймеров, приведенных в таблице. Все праймеры были синтезированы на синтезаторе Applied Biosystems ABI 3900. Амплифицированные фрагменты ДНК клонировали в вектор в pAL-TA («Евроген», Россия) и переклонировали в вектор pGL3 Basic Vector (Promega, WI, США) по соответствующим сайтам рестрикции перед геном люциферазы *Photinus pyralis*. Плазмидные клоны с промоторами в нужной ориентации отбирали с помощью рестрикционного анализа и секвенирования ДНК. Итоговые клоны с промоторами генов *CDC6*, *CKS1B*, *PLK1* не содержали замен нуклеотидов, а клоны с промоторами *POLD1* и *MCM2* содержали соответственно одну и две замены по отношению к нуклеотидным последовательностям, представленным в NCBI GenBank. Плазмидными клонами, содержащими клонированные промоторы, мы трансфицировали клетки следующих линий: A375 (злокачественная меланома, ATCC), A431 (эпидермоидная карцинома кожи, ATCC), A549 (рак легкого, ATCC), Calu1 (эпидермоидный рак легкого, ECACC), HepG2 (гепатоклеточный рак, ATCC), HT1080 (фибросаркома, ATCC), Panc-1 (эпителиоидный рак поджелудочной железы, ATCC), а также нормальные фибробласты IVL-7C. Фибробласты IVL-7C получены из морфологически нормальной ткани легкого от больного, оперированного по поводу рака легкого в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, с использованием методики, описанной ранее [11]. В качестве внутреннего контроля трансфекции применяли котрансфекцию с плазмидой pRL-TK (Promega, WI), экспрессирующей ген *Rluc*. Для нормирования результатов экспериментов использовали параллельную трансфекцию клеток векторами pGL3 Basic Vector, pGL3 Promoter Vector (Promega, WI) и pGL3-CMV Pr/Enh, содержащим перед геном *Luc* фрагмент AseI/BglII промотора ранних генов цитомегаловируса из плазмиды pEGFP-N1 (Clontech Laboratories, Inc.). Для сравнения опухолевой специфичности промоторов клетки трансфицировали плазмидой на основе pGL3, содержащей промотор гена сурвивина (*BIRC5*) длиной 1500 п.н. [12]. Трансфекцию клеток проводили в 24-луночных планшетах с помощью Липофектамина 2000 (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя. Активность промоторов оценивали по хемилюминесценции клеточных экстрактов. Хемилюминесценцию измеряли с помощью набора Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega, США) на планшетном люминиметре GENios Pro (Tecan, Швейцария). Значения

люминесценции для люциферазы *P. pyralis* нормировали по люминесценции для люциферазы *Renilla reinformis* в каждом измерении, вводили поправку на фоновую активность люциферазы по плазмиде pGL3 Basic Vector. Полученные значения усредняли по двум повторам в каждом эксперименте и по трем повторным экспериментам. Данные нормировали по активности люциферазы *P. pyralis* под контролем промотора SV40 в составе pGL3 Promoter Vector.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В опытах по трансфекции показано, что клонированные промоторы проявляют активность во всех использованных клетках. Следует отметить, что цитомегаловирусный промотор (CMV) в составе конструкции pGL3-CMV Promotor/Enhancer Vector работал в 100–1000 раз сильнее всех остальных промоторов. Активность промоторов генов *POLD1*, *CDC6*, *CKS1B*, *PLK1* и *MCM2* во всех опухолевых клетках человека оказалась выше, чем у промотора SV40, и была сопоставима с активностью промотора гена *BIRC5* (рис. 1А). В то же время в нормальных фибробластах исследуемые промоторы (за исключением промотора CMV) обеспечивали значительно более низкий уровень активности люциферазы, чем промотор SV40. Чтобы оценить опухолевую специфичность каждого клонированного промотора, мы рассчитали отношение уровней хемилюминесценции лизатов опухолевых клеток и фибробластов, трансфицированных плазмидами с соответствующими промоторами, и медиану этих отношений в качестве обобщенного показателя опухолевой специфичности промотора (рис. 1Б). Промотор гена *BIRC5*, как и в предыдущем исследовании [12], во всех опухолевых клетках был более активен, чем в нормальных фибробластах. Активность пяти клонированных промоторов в опухолевых клетках также превышала их активность в нормальных фибробластах ($p < 0.01$, тест Манна–Уитни). Опухолевая специфичность промоторов *POLD1*, *CDC6*, *CKS1B* и *MCM2* незначительно превышала этот показатель для промотора *BIRC5*. Промотор *PLK1* оказался намного специфичнее промотора *BIRC5* ($p < 0.01$ в тесте Манна–Уитни). Промотор CMV не проявил специфичности: он функционировал в одних опухолевых клетках сильнее, а в других слабее, чем в фибробластах.

Как отмечено выше, гены *CKS1B* и *SHC1* расположены в направлении «голова к голове» и, вероятно, используют общий двунаправленный промотор [6]. Поэтому при клонировании промотора *CKS1B* мы дополнительно отобрали плазмидный клон pGL3, содержащий этот промотор в противоположной ориентации. Координаты клонированного фрагмента ДНК по отношению к ТНТ гена *SHC1* соответство-

вали (–264; +751). Чтобы проверить промоторную активность клонированного фрагмента, мы трансфицировали этим клоном клетки A549 и нормальные фибробласты и измерили хемилюминесценцию клеточных лизатов. Результаты представлены на рис. 2. Здесь же для сравнения показаны результаты определения активности промотора *CDC6*, встроенного в противоположной ориентации (*CDC6-rev*), активность которого была такой же, как у контрольного вектора pGL3-BV, и промотора *BIRC5* в прямой ориентации. Оказалось, что активность клонированного промотора *SHC1* превышает активность промотора *CKS1B* как в опухолевых клетках, так и в нормальных фибробластах. Активность промотора *SHC1* в клетках аденокарциномы A549 примерно в 8 раз больше, чем в нормальных фибробластах, что меньше этого показателя для промотора *CKS1B*, но сопоставимо с опухолевой специфичностью промотора *BIRC5* (не показано). Поскольку спектр опухолей, в которых повышена экспрессия гена *SHC1*, меньше, чем опухолей с повышенной экспрессией других генов, использованных в нашей работе (GeneHub GEPIS, [10]), мы не изучали промотор *SHC1* на других клетках.

Таким образом, мы клонировали промоторы пяти генов, которые регулируют репликацию ДНК и деление клеток, проявляют опухолеспецифичную экспрессию и играют важные роли в процессах канцерогенеза. При трансфекции клеток плазмидными векторами, экспрессирующими ген люциферазы под управлением данных промоторов, эти промоторы проявили заметно большую активность в опухолевых клетках различного происхождения, чем в нормальных фибробластах. Активность и опухолевая специфичность клонированных промоторов, за исключением промотора *PLK1*, была сопоставима с показателями для ранее изученного промотора *BIRC5*, причем специфичность промоторов незначительно снижалась в ряду *CKS1B*, *POLD1*, *MCM2*, *CDC6*. Промотор *PLK1* обладал существенно большей опухолевой специфичностью при том, что уровни экспрессии репортерного гена под управлением промоторов *PLK1* и *BIRC5* в опухолевых клетках были примерно одинаковыми. Это выгодно отличает промотор *PLK1* от остальных промоторов и позволяет считать его наиболее перспективным для создания противоопухолевых генно-инженерных конструкций.

Мы также показали двунаправленную активность и высокую опухолевую специфичность клонированного промотора *CKS1B/SHC1*. Эти особенности следует учитывать при создании генно-инженерных векторов с данным промотором, так как его двунаправленная активность может приводить к нежелательной транскрипции последовательностей вектора

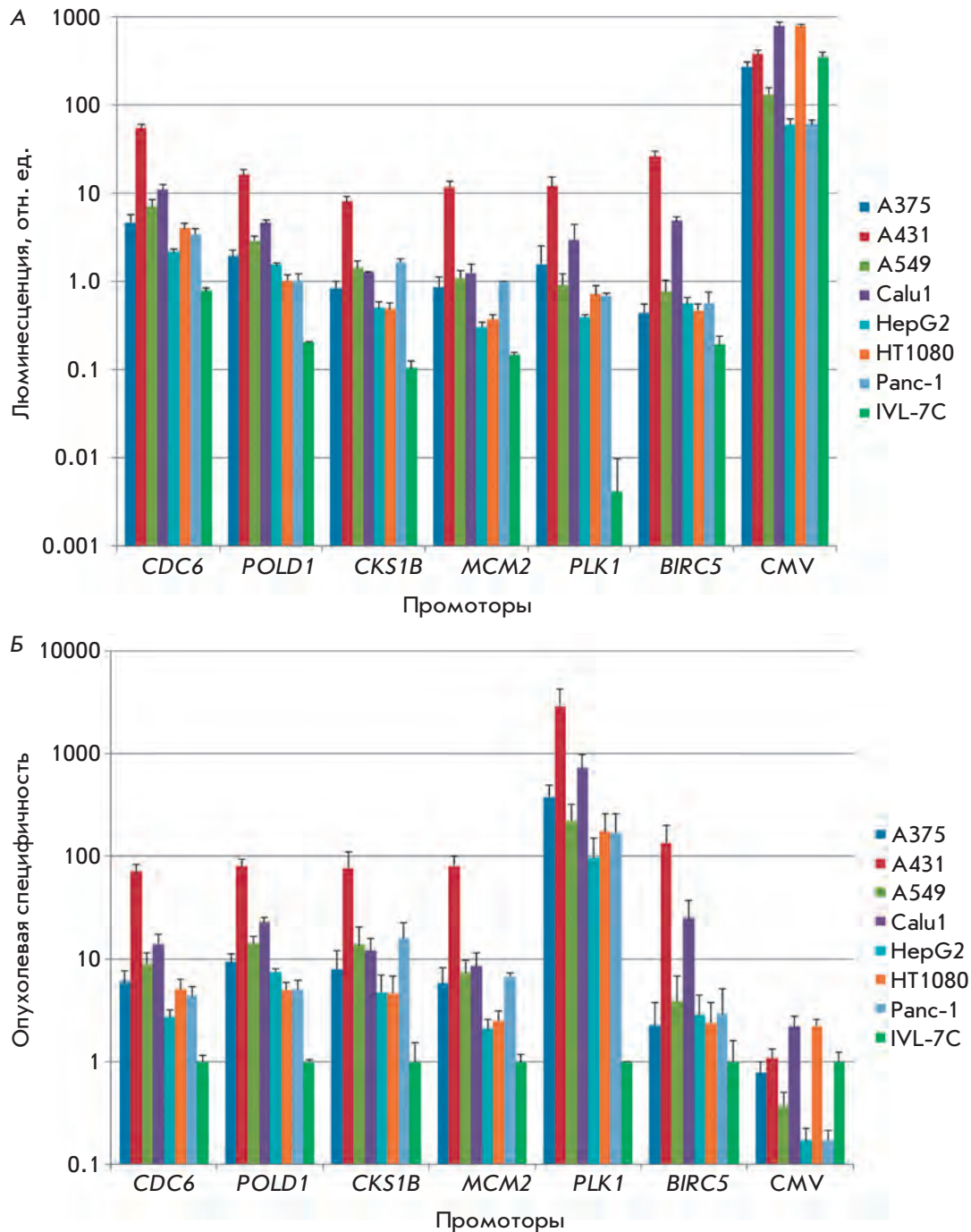


Рис. 1. Активность и опухолевая специфичность промоторов. А – Хемилюминесценция лизатов клеток, трансфицированных плазмидами с соответствующими промоторами (логарифмическая шкала). Представлены средние значения и стандартная ошибка среднего (SEM). Б – Опухолевая специфичность промоторов как отношение уровней хемилюминесценции лизатов опухолевых клеток и фибробластов для каждого промотора. М – медиана отношений уровней хемилюминесценции, обобщенный показатель опухолевой специфичности промотора

Промотор	<i>CDC6</i>	<i>POLD1</i>	<i>CKS1B</i>	<i>MCM2</i>	<i>PLK1</i>	<i>BIRC5</i>	<i>CMV</i>
М	5.95	9.37	12.19	6.80	220.00	2.94	0.78

в направлении, противоположном терапевтическому гену. С другой стороны, данный промотор, вероятно, можно использовать для одновременной экспрессии в опухолях двух терапевтических генов либо для создания противоопухолевых конструкций бинарного действия с более сложной регуляцией. Необходимо

дальнейшее изучение промотора *CKS1B/SHC1* и генов, экспрессию которых он направляет, в различных тканях и опухолях.

Следует отметить, что в работе использовали всего один неопухолевый контроль – нормальные фибробласты легкого. Учитывая источник клеток (нормаль-

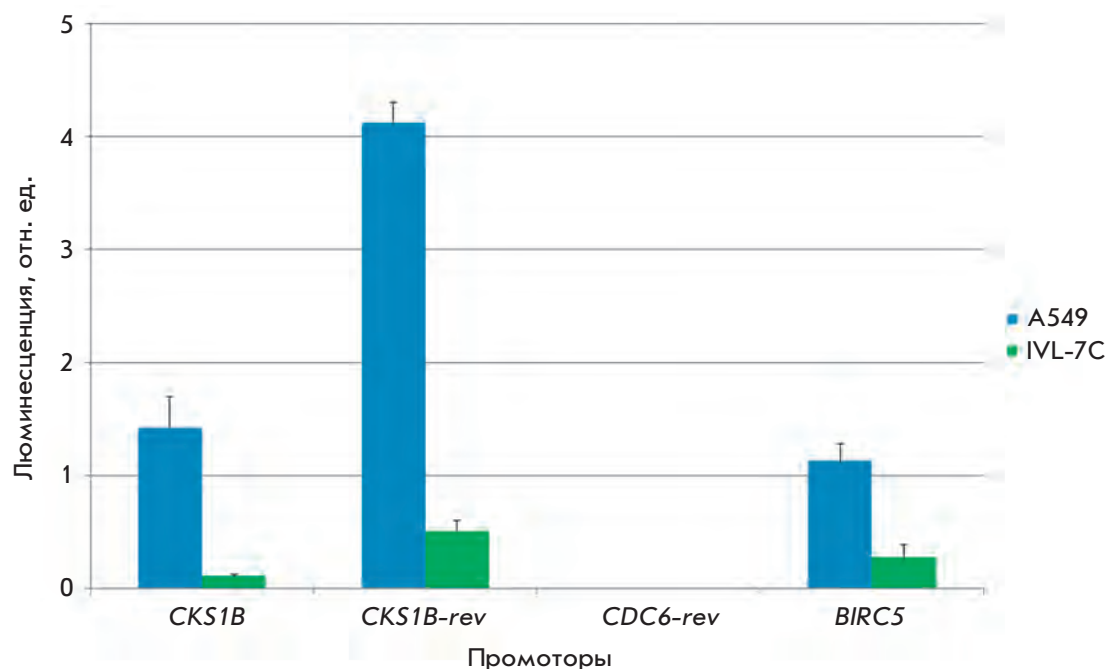


Рис. 2. Хемилюминесценция лизатов клеток A549 и IVL-7C, трансфицированных плазмидами на основе pGL3 с промоторами в прямой и обратной (rev) ориентациях. Показаны средние значения и стандартная ошибка среднего (SEM). Объяснения в тексте

ная ткань больного раком легкого), а также тот факт, что свойства клеток, делящихся в культуре, могут отличаться от их свойств в живом организме, клонированные промоторы необходимо изучить на моделях *in vivo*, чтобы получить однозначные выводы об опухолевой специфичности промоторов.

Значительная длина клонированных промоторов (от 1016 до 2373 п.н.) позволяет предположить, что они содержат наиболее важные элементы регуляции транскрипции, включающие кор-промотор и проксимальные регуляторные элементы. Однако нельзя исключить, что существуют дополнительные удаленные регуляторные элементы такие, как энхансеры, сайленсеры или другие элементы, которые также уча-

ствуют в регуляции активности данных промоторов. Сопоставление эндогенной активности соответствующих генов в различных клеточных линиях и тканях с полученными в нашей работе результатами позволит оценить относительный вклад собственно промотора и дополнительных регуляторных элементов. ●

Работа поддержана программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», программой «Ведущие научные школы РФ» (НШ1674.2012.4), а также Министерством промышленности и торговли РФ (Государственный контракт № 11411.1008700.13.084, 2011-2013).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kawakami H., Katayama T. // *Biochem. Cell Biol.* 2010. V. 88. P. 49–62.
2. Borlado L.R., Mendez J. // *Carcinogenesis*. 2008. V. 29. P. 237–243.
3. Lange S.S., Takata K., Wood R.D. // *Nat. Rev. Cancer*. 2011. V. 11. P. 96–110.
4. Martinsson-Ahlzen H.S., Liberal V., Grunenfelder B., Chaves S.R., Spruck C.H., Reed S.I. // *Mol. Cell Biol.* 2008. V. 28. P. 5698–5709.
5. Krishnan A., Nair S.A., Pillai M.R. // *J. Cell Mol. Med.* 2010. V. 14. P. 154–164.
6. Davila Lopez M., Martinez Guerra J.J., Samuelsson T. // *PLoS One*. 2010. V. 5. P. e10654.
7. Rajendran M., Thomes P., Zhang L., Veeramani S., Lin M.F. // *Cancer Metastasis Rev.* 2010. V. 29. P. 207–222.
8. Masai H., You Z., Arai K. // *IUBMB Life*. 2005. V. 57. P. 323–335.
9. Song B., Liu X.S., Liu X. // *Cell. Div.* 2012. V. 7. P. 3.
10. Zhang Y., Luoh S.M., Hon L.S., Baertsch R., Wood W.I., Zhang Z. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. P. W152–158.
11. Kopantzev E.P., Vayshlya N.A., Kopantseva M.R., Egorov V.I., Pikunov M., Zinovyeva M.V., Vinogradova T.V., Zborovskaya I.B., Sverdlov E.D. // *Br. J. Cancer*. 2010. V. 102. P. 1533–1540.
12. Mityaev M.V., Kopantzev E.P., Buzdin A.A., Vinogradova T.V., Sverdlov E.D. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2010. V. 75. P. 182–191.