

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

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**

кандидат химических наук

Чернов Игорь Павлович

Москва 2020

## Оглавление

1. ВВЕДЕНИЕ .....	4
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
2.1. Проблема рака и рак поджелудочной железы .....	6
2.2. Эмбриогенез и канцерогенез .....	8
2.2.1. Эпителиально-мезенхимальный переход .....	9
2.2.2. Раковые стволовые клетки .....	12
2.2.3. Мастер гены и опухолевая прогрессия .....	13
2.3. Мастер гены поджелудочной железы .....	16
2.3.1. Строение поджелудочной железы.....	16
2.3.2. Эмбриогенез поджелудочной железы.....	17
2.3.3. Сети генных взаимодействий, координирующие эмбриогенез поджелудочной железы .....	18
2.3.4. Мастер регуляторы развития и канцерогенеза поджелудочной железы.....	20
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ МАТЕРИАЛЫ .....	31
3.1. Материалы.....	31
3.2. Методы .....	40
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....	50
4.1. Относительный уровень экспрессии мастер генов в опухолевых, нормальных и фетальных образцах ПЖ.....	50
4.2. Выбор модельных систем для исследования роли мастер генов при раке ПЖ .....	57
4.2.1. Характеристика экспрессии генов-маркёров эпителиального и мезенхимального состояния клеток, а также мастер генов развития поджелудочной железы и их продуктов в модельных клеточных линиях .....	59
4.3. Индукция эпителиально-мезенхимального перехода в клетках рака поджелудочной железы под действием TGFβ1 .....	62

4.3.1 Характеристика фенотипа клеток и экспрессии белков-маркёров эпителиального и мезенхимального состояния клеток при индукции клеток линии PANC-1 фактором TGFβ1 .....	63
4.3.2. Изменение экспрессии генов-маркеров ЭМП и мастер генов развития поджелудочной железы при индукции клеток линии PANC-1 фактором TGFβ1 .....	64
4.4. Исследование влияния экзогенной экспрессии PDX1 на злокачественный потенциал культур низкодифференцированных клеток PANC-1 и высокодифференцированных клеток VхРС-3 .....	67
4.4.1. Получение клеточных культур PANC-1 и VхРС-3, экзогенно экспрессирующих PDX1 .....	67
4.4.2 Определение уровня экспрессии гена PDX1 и его продукта в клетках PANC-1 <sup>PDX1</sup> и VхРС-3 <sup>PDX1</sup> .....	68
4.4.3 Изменения экспрессии тканеспецифических транскрипционных факторов в клетках PANC-1 <sup>PDX1</sup> и VхРС-3 <sup>PDX1</sup> .....	70
4.4.4. Анализ содержания в локусах исследуемых генов гистоновых меток активных энхансеров и известных сайтов связывания PDX1 .....	73
4.4.5. Влияние экзогенной экспрессии PDX1 на пролиферативный потенциал клеток PANC-1 и VхРС-3.....	74
4.4.6. Влияние экзогенной экспрессии PDX1 на миграционный потенциал .....	77
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	86
6. ВЫВОДЫ.....	88
7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	89
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	92

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Опухолевые заболевания являются одной из основных причин смерти в мире и представляют собой наиболее серьезную проблему медицины. 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 [1].

Одним из наиболее трудно поддающихся лечению видов злокачественных новообразований является рак поджелудочной железы [2], [3]. Рак поджелудочной железы в последние десятилетия становится лидирующим онкологическим заболеванием, стоит на 7-м месте среди причин гибели мужчин и женщин от рака и является 10-ой по распространенности злокачественной опухолью. В 2018 году в мире было зарегистрировано почти 460 тысяч новых случаев этого заболевания [4]. В России этот показатель в 2018 году составил около 15 тысяч [1]. Около 95% всех случаев рака поджелудочной железы приходятся на экзокринную часть поджелудочной железы, инфильтрирующая протоковая аденокарцинома – самое распространенное и наиболее агрессивное среди этих новообразований [5]. Пятилетняя выживаемость пациентов с этим диагнозом составляет всего 5% [6]. Несмотря на развитие и совершенствование традиционных подходов к лечению онкологических заболеваний, проблема лечения большинства форм рака 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. Этот процесс может представлять собой общее характерное явление, указывающее на историю возникновения опухоли и на ее клеточный предшественник в организме [7], [8]. Рак при таком рассмотрении оказывается не просто генетической болезнью, связанной с накоплением и проявлением мутаций, но и болезнью системы развития той ткани, в которой возникает рак. А гены, в которых накапливаются мутации, - это гены, вовлеченные в развитие данной ткани. Существует предположение, что так называемые мастер регуляторные гены, играющие определяющую роль

в процессе развития, могут также играть ключевую роль в процессах канцерогенеза [7], [9]. Под мастер регулятором принято подразумевать тот ген, экспрессия которого необходима и достаточна, чтобы включить активацию множества других генов и определить направление клеточного развития [10]. В основу определения мастер гена предлагалось [11] положить его способность перепрограммировать клетки одного типа в клетки другого типа.

Мастер регуляторные гены образуют сети взаимодействия факторов, которые играют ключевую роль в поддержании и амплификации клеток предшественников и выборе дальнейшего пути дифференцировки. Взаимодействия мастер регуляторных факторов влияют на возникновение и развитие различных патологических процессов, в том числе, и на развитие рака [12].

Среди регуляторных генов эмбриогенеза поджелудочной железы мы выделили потенциальные мастер 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 поджелудочной железы. Целью данного исследования стало изучение роли этих генов в процессе развития протоковой аденокарциномы поджелудочной железы и их вовлеченности в процесс метастазирования клеток рака поджелудочной железы.

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1. Проблема рака и рак поджелудочной железы

Опухолевые заболевания являются одной из основных причин смерти в мире и представляют собой наиболее серьезную проблему медицины. 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 [1].

Несмотря на громадное число фундаментальных открытий и масштабные федеральные и индустриальные вложения, рак рассматривается, в лучшем случае, как заболевание, только минимально поддающееся контролю средствами современной медицины, особенно по сравнению с другими распространенными болезнями. Смертность от рака в 21 веке такая же, как и 50 лет назад, тогда как смертность от сердечных, церебрососудистых и инфекционных болезней уменьшилась за это время на 2/3 [13]. На протяжении последнего десятилетия заболеваемость увеличилась на 14%, а ежегодный прирост смертности составляет до 1,5%.

Одним из наиболее трудно поддающихся лечению видов злокачественных новообразований является рак поджелудочной железы (РПЖ) [2]. Рак поджелудочной железы в последние десятилетия становится лидирующим онкологическим заболеванием, стоит на 4-м месте среди причин гибели мужчин и женщин от рака и является 10-ой по распространенности злокачественной опухолью. В мире ежегодно регистрируется до 200 тысяч новых случаев этого заболевания. В России этот показатель в 2018 году составил около 15 тысяч новых заболевших [1].

Около 95% всех случаев рака поджелудочной железы (ПЖ) приходится на экзокринную часть поджелудочной железы. Инфильтрирующая протоковая аденокарцинома поджелудочной железы (ПАПЖ) является самой распространенной и наиболее агрессивной среди этих новообразований. Пятилетняя выживаемость пациентов с этим диагнозом всего 5% [6]. Менее распространены нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы (1-2% всех РПЖ), для которых пятилетняя выживаемость значительно выше - 65%, и серозные цистоаденомы поджелудочной железы, которые практически полностью излечимы. Кроме того, существуют внутрипротоковые папиллярные муцинозные новообразования (IPMNs) и муцинозно-кистозные неоплазии, излечимые на ранних этапах и прогрессирующие в неизлечимые аденокарциномы

при отсутствии медицинского вмешательства [4]. Более 80% пациентов с прогрессирующим злокачественным заболеванием имеют неоперабельные опухоли, но даже для тех, кто был подвергнут хирургическому вмешательству, последующее лечение остается малоэффективным (5-летняя выживаемость после операции составляет всего лишь 20%) [14]. Основными причинами высокой смертности пациентов с раком поджелудочной железы являются отсутствие методов своевременной диагностики заболевания, раннее метастазирование и низкая эффективность химиотерапевтического лечения больных.

Основные драйверные мутации при прогрессии рака поджелудочной железы происходят в следующих генах: KRAS в 90% случаев, CDKN2A- также в 90% случаев, TP53 – в 70%, SMAD4 (55%). Кроме того, нарушения в сигнальных путях Notch (5%) и WNT (10%), структуре хроматина (20%), репарации ДНК (17%), регуляции клеточного цикла (15%) также являются вовлеченными в прогрессию рака поджелудочной железы [15].

Эти генетические изменения приводят к критическим нарушениям фундаментальных контролирующих процессов в нормальной клетке поджелудочной железы, что в итоге инициирует формирование и направляет рост крайне агрессивной опухоли. Однако уверенности в том, что вышеперечисленные гены являются необходимыми и достаточными для инициации и развития опухоли, нет. Постоянно в научной литературе описывают новые гены, которым приписывается важная роль в развитии ПАПЖ. Более того, все чаще появляются данные, свидетельствующие о том, что даже такие фундаментальные изменения, как описаны выше, недостаточны для ракового перерождения клеток поджелудочной железы. В частности, было показано, что клетки ПЖ устойчивы к раковому перерождению при трансформации онкогенной формой гена KRAS, даже при условии, что в них уже содержатся неактивные формы опухолевых супрессоров p53 или INK4A (CDKN2A) [16]. Исключением является субпопуляция клеток ПЖ, экспрессирующих ген PDX1 [17].

За прошедшие годы лечение пациентов с раком поджелудочной железы заметно улучшилось, поскольку теперь можно использовать и применять надежные методы определения операбельности рака. Тем не менее, только в около 10% случаев ПАПЖ может быть проведено хирургическое вмешательство на момент постановки диагноза. В целом, неудачи ранней идентификации опухоли приводят к значительной заболеваемости и смертности [15]. Существенные пробелы остаются в понимании этого заболевания и вариантов лечения, хотя постоянное развивающиеся методы по-прежнему имеют ограниченный успех [18].

## 2.2. Эмбриогенез и канцерогенез

Канцерогенез представляет собой сложный многостадийный процесс, включающий в себя как появление опухолевых клеток, так и дальнейшее изменение их свойств. К основным изменениям, сопровождающим опухолевую прогрессию, относят: увеличение генетической нестабильности, утрату дифференцировки, нарушение контроля пролиферации, увеличение клеточной подвижности, появление способности к инвазии и метастазированию, избегание иммунологического надзора, активацию теломеразы, нарушение реализации запрограммированной клеточной смерти, появление независимости от внешних ростовых факторов, нарушения межклеточных контактов и контактов с внеклеточным матриксом, стимуляцию ангиогенеза, изменения в энергетических системах клетки, индукцию воспалительного ответа в прилежащих к опухоли областях (Рис.1) [19],[20].



**Рис.1.** Основные изменения, сопровождающие развитие опухоли по [20]

Происхождение раковых клеток является наиболее фундаментальной, но нерешенной проблемой в исследованиях рака. Общепринятой теории возникновения и развития рака не существует. В последние 50 лет исследователи, изучающие рак, в основном, сосредоточились на модели, в которой образование рака рассматривается как накопление нарушений, возникающих из-за генетических и молекулярных изменений в соматических клетках, а опухоли интерпретируются как кластеры быстро реплицирующихся мутантных клеток, которые выживают или умирают в соответствии с принципами теории эволюции [21]. Эта самая известная и принятая модель – мутационная теория рака сталкивается с растущим количеством экспериментальных данных, которые либо не могут быть объяснены моделью, либо

противоречат этой модели [22]. Так, например, при изучении трех подтипов эпендимоидных опухолей головного мозга было показано, что один подтип имеет внутривнутриклеточную транслокацию, создающую новый управляющий опухолью ген, у другого типа отсутствуют такие мутации, но есть aberrантные эпигенетические модификации, а у третьего нет ни мутаций, ни эпигенетических aberrаций [23]. С другой стороны, были обнаружены тысячи мутаций в связанных с канцерогенезом генах, в том числе в драйверных генах, в эпидермисе нормального века, где редко развивается рак [24]. Эти наблюдения противоречат мутационной гипотезе, потому что, если мутации действительно являются исключительной причиной рака, то как можно объяснить, с одной стороны, существование рака без мутаций, а с другой - тот факт, что в нормальных тканях могут быть представлены массовые генетические изменения, включая изменения в драйверных и онкосупрессорных генах [22].

Очевидно, сведение к минимуму происхождения рака до одной или нескольких мутаций или определенного типа клеток недостаточно для объяснения того, что опухоль представляет собой доброкачественные или злокачественные органы или плюрипотентные тератомы, полученные из стволовых клеток, которые рекапитулируют все три зародышевых слоя человеческого развития [21].

Существует также эмбриологическая теория происхождения рака, в пользу которой говорят наблюдения о том, что канцерогенез может включать набор обычных клеточных процессов, используемых для формирования эмбриона во время морфогенеза. Эти процессы обеспечивают гармоничное и последовательное конструирование структурной основы эмбриона, а их реализация в качестве эмбрионального процесса включает совместную регуляцию дифференцировки, пролиферации, клеточной инвазии и миграции, что позволяет человеку воссоздать каждое поколение. С другой стороны, рак представляет собой аномальное состояние клетки, которое может возникнуть в стволовых клетках взрослого человека, при котором этот механизм совместного регулирования генов дифференцировки, пролиферации, инвазии клеток и миграции может быть повторно активированным в совершенно неуместном контексте [25].

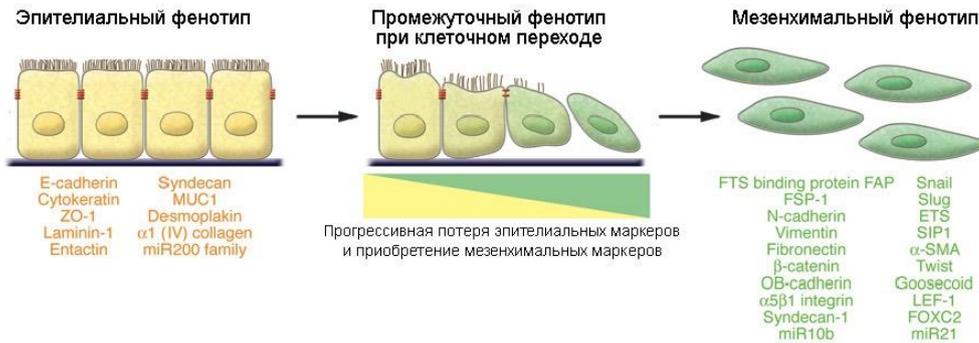
### **2.2.1. Эпителиально-мезенхимальный переход**

Кроме того, фундаментальным аспектом этой гипотезы о происхождении рака является эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) и обратный ему мезенхимально-эпителиальный переход (МЭП), которые происходят во время гаструляции эмбриона. В процессе опухолевой прогрессии реактивация эмбриональной программы ЭМП ответственна за метастатическое распространение раковых клеток от первичной опухоли. Девяносто процентов смертей от рака вызваны не ростом первичной опухоли, а именно метастазами [26]. ПАПЖ является типичным

примером, где метастазирование является основной причиной смертности. Процессы ЭМП и МЭП включают специфическую регуляцию транскрипции, и они ответственны за одновременное управление процессами пролиферации, миграции, дифференцировки клеток и инвазии.

ЭМП разделяют на три различных подтипа, которые зависят от физиологического контекста [27] [28] [29]. ЭМП первого типа принято считать процессы, которые происходят при эмбриогенезе. Этот тип ЭМП имеет место в строго определенный период эмбрионального развития во время гаструляции, где он является основой образования первичной мезенхимы трехслойного зародыша [30]. Второй тип ЭМП включает в себя процессы, связанные с регенеративными процессами, например, заживлением ран [27]. ЭМП третьего типа, в отличие от описанных выше типов ЭМП, происходит в генетически и эпигенетически измененных клетках опухолей. ЭМП дает возможность клеткам карцином приобретать способность к инфильтрации в окружающие нормальные ткани и приводит к метастазированию опухоли, что является наиболее серьезной угрозой для онкологических больных. ЭМП третьего типа часто наделяет опухолевые клетки стволовыми свойствами, что позволяет этим клеткам становиться раковыми стволовыми клетками, которые в свою очередь и обеспечивают рост опухоли и распространение метастазов [27] [28] [29].

Ключевыми событиями в ЭМП являются: растворение эпителиальных межклеточных соединений; потеря апикально-базальной полярности и приобретение передне-задней полярности; реорганизация архитектуры цитоскелета и изменение формы клеток; снижение экспрессии генов, ответственных за эпителиальный фенотип и активация генов, которые формируют мезенхимальный фенотип (Рис. 2), увеличение подвижности и, во многих случаях, способность к ремоделированию внеклеточного матрикса, обеспечивающая возможность инвазии клеток. Важно отметить что, клетки, которые подвергались ЭМП, приобретают устойчивость к старению и апоптозу [30].



**Рис.2.** ЭМП и основные маркеры эпителиальных и мезенхимальных клеток. Колокализация этих двух наборов различных маркеров определяет промежуточный фенотип ЭМП, что указывает на клетки, которые лишь частично прошли ЭМП. [27]

Отличительной чертой ЭМП является снижение экспрессии E-кадгерина, приводящее к дестабилизации адгезионных контактов. Кроме того, подавление экспрессии генов, кодирующих клаудины, окклюдины, десмоплакин и плакофилин, стабилизирует растворение апикальных плотных контактов и десмосом, соответственно [31]. Эти изменения в экспрессии генов, предотвращают образование новых эпителиальных межклеточных контактов и приводят к потере функции эпителиального барьера. Репрессия экспрессии генов, кодирующих эпителиальные белки клеточных контактов, сопровождается активацией генов, продукты которых способствуют мезенхимальной адгезии. В частности, снижение экспрессии E-кадгерина уравновешивается повышением экспрессии мезенхимального нейронального кадгерина (N-кадгерина), что ведет к "переключению кадгерина", которое в дальнейшем приводит к изменению клеточной адгезии. Изменения в экспрессии генов, кодирующих цитоскелет и белковые комплексы полярности, также способствуют прохождению ЭМП. Строение промежуточных филаментов изменяется с уменьшением уровня экспрессии цитокератина и активацией экспрессии виментина [31].

Обратимая супрессия E-кадгерина управляется эпигенетическим сайленсингом, а также сетью транскрипционных репрессоров, включающей *SNAI1*, *SLUG*, *TWIST1*, *ZEB1*, *ZEB2* и многие другие, которая направлена на промотор гена *CDH1* [32]. Поскольку эти факторы транскрипции имеют различные профили экспрессии, их вклад в ЭМП зависит от клеток или типа тканей, вовлеченных в сигнальные пути, которые инициируют ЭМП. Они часто контролируют экспрессию друг друга и функционально кооперируются на целевых генах *CDH1* [32], а дополнительные факторы транскрипции далее детально определяют программу ЭМП и приводят в движение прогрессию ЭМП. Вместе факторы транскрипции ЭМП координируют

подавление эпителиальных генов и индукцию мезенхимальных генов, и часто одни и те же факторы транскрипции направляют и репрессию, и активацию [33].

### 2.2.2. Раковые стволовые клетки

В последние четверть века интенсивно развивалась модифицированная версия эмбриональной теории рака, которая сводит эмбрион к определенному типу стволовых клеток, называемых «раковые стволовые клетки» [21]. Раковые стволовые клетки представляют собой подмножество клеток, особенностями которых являются самообновление, мультипотентность и способность образовывать опухоли. Эти злокачественные клетки называются раковые стволовые клетки, и в их поддержании большую роль играет микроокружение. Они возникают из нормальных стволовых клеток или клеток-предшественников вследствие возникновения мутаций и обычно устойчивы к традиционным методам лечения [34].

Наиболее заметной и специфической особенностью, которая может наблюдаться в раковых стволовых клетках, является рекапитуляция эмбриональных плюрипотентных сетей и избыточная экспрессия эмбриональных генов. Во время эмбриогенеза сигнальные пути TGF- $\beta$ , FGFR/MAPK или Akt, Wnt, Notch и sonic hedgehog поддерживают самообновление и плюрипотентность эмбриональных стволовых клеток [35]. Эти пути в конечном итоге активируют три основных фактора транскрипции: Oct3 / 4, SOX2 и Nanog. Эти факторы активируют специфичные гены и поддерживают состояние эмбриональных стволовых клеток путем ингибирования генов дифференцировки. Во время развития эмбриона и спецификации органа, плюрипотентные гены ингибируются, и гены дифференцировки активируются. Таким образом, во взрослых тканях уровни экспрессии генов «стволовости» *Oct3 / 4*, *SOX2*, *Nanog* и других эмбриональных очень низки. Однако во время инициации и прогрессирования рака эти гены и сети активируются [35].

При этом вероятно раковые стволовые клетки и опухоль-инициирующие клетки – это разные структуры. Опухоль-инициирующие клетки являются первыми клетками, из которых развивается опухоль, а раковые стволовые клетки существуют в растущем новообразовании и определяют способность размножаться в опухолях при серийной трансплантации [36]. Скорее всего, клетка, которая дает начало раку, является взрослой стволовой клеткой. Только они существуют на протяжении длительного времени, и поэтому способны накапливать повреждения ДНК [37], [38]. Кроме того, взрослые стволовые клетки в целом являются мультипотентными (иногда унипотентными), и это может объяснить изменчивость типов клеток, обнаруживаемых в большинстве опухолей. Взрослые стволовые клетки, как правило, в состоянии покоя, обладают значительным потенциалом самообновления, что может иметь решающее значение для роста опухоли [37]. Существуют экспериментальные данные, которые

были получены в результате отслеживания клонов, и они позволяют предположить, что взрослые стволовые клетки действительно могут быть опухоль-иницирующими клетками при различных солидных опухолях [39]. В исследовании [40] было показано, что агрессивные раковые эпителиальные клетки обладают теми же транскрипционными паттернами, что и эпителиальные взрослые стволовые клетки. Также в работе [41] было показано, что спектры мутаций генов, связанных с канцерогенезом, аналогичны спектрам мутаций тканеспецифических взрослых стволовых клеток, что позволяет предположить, что мутации во взрослых стволовых клетках могут вызывать канцерогенез.

Кроме взрослых стволовых клеток за образование опухоль инициирующих клеток могут отвечать процессы метаболического репрограммирования и дедифференцировки клеток. Так, например, повышенный уровень гликолиза с образованием АТФ, даже в присутствии кислорода, и превращение пирувата в лактат, создает состояние ферментативного метаболизма, которого очень способствует активности раковых клеток [42]. Дедифференцировка в раковые стволовые клетки может происходить в ответ на различные факторы, такие как повреждения и стрессовые воздействия, что приводит к возникновению и прогрессированию рака [35]. Исследование [43] показало, что клетки глиомы могут дедифференцироваться в стволовые клетки глиомы в ответ на стресс и вызванную гипоксией передачу сигналов HIF1 $\alpha$ .

Повреждения тканей также могут индуцировать эпидермальные стволовые клетки в к превращению их в стволовые клетки, и такой механизм может быть реализован при возникновении рака поджелудочной железы. На сегодняшний день принято считать, что в поджелудочной железе нет взрослых стволовых клеток [44], и существует предположение, что в роли инициирующих опухоль клеток могут выступать образующиеся в ответ на повреждения стволовые клетки, которые возникают из взрослых дифференцированных клеток. [45]. Такие факультативные стволовые клетки поджелудочной железы образуются из ацинарных клеток, экспрессирующих транскрипционные факторы *Ptfla*, *Sox9*, и *Hnflb*, при повреждении, при этом образуются клетки, подобные мультипотентным клеткам предшественникам, которые существуют также в естественном процессе развития поджелудочной железы. [45]. Ген *Ptfla* способствует дифференцировке предшественников в ацинарные клетки [46] и именно ацинарные клетки, приобретая онкогенную мутацию в гене *Kras*, через трансдифференцировку их в протоковые могут быть предшественниками раковых стволовых клеток в ПАПЖ [47].

### 2.2.3. Мастер гены и опухолевая прогрессия

Транскрипционные факторы, к которым относятся, в том числе, *Ptfla*, *Sox9*, и *Hnflb*, относятся к важнейшим регуляторам – мастер генам эмбриогенеза поджелудочной железы, вместе с другими транскрипционными факторами они определяют направления

дифференцировки клеток предшественников поджелудочной железы. Активация мастер генов в клетках предшественниках способствует реализации эмбриональной программы формирования органа. Эти гены развития могут быть важными детерминантами клеточной дифференцировки, играющими жизненно важную роль в инициации и прогрессировании опухолей [7],[9, 25].

В геномике и транскриптомике под мастер регулятором понимают любой транскрипционный фактор, который способен вызвать каскад последующих взаимозависимых включений экспрессии генов. В биологии развития под мастер регулятором понимают регулятор, который определяет судьбу определенной клеточной линии. По данным S.Chan и M.Kuba термин мастер регуляторный ген или мастер регулятор был введен известным генетиком и эволюционистом С.Оно (S. Ohno) более 30 лет тому назад, для обозначения гена, занимающего верхнюю позицию в иерархии транскрипционной регуляции и не находящегося под регуляторным контролем никакого другого гена [11].

Под мастер регулятором принято подразумевать тот ген, экспрессия которого необходима и достаточна, чтобы включить активацию множества других генов и определить направление клеточного развития. Еще один аспект концепции мастер регулятора заключается в том, что он экспрессируется в ограниченном круге клеток, главным образом в клетках, принадлежащих определенному направлению дифференцировки [10]. В основу определения мастер гена предлагалось [11] положить его способность перепрограммировать клетки одного типа в клетки другого типа. Сравнение спектров экспрессии генов в опухолях и в клетках-предшественниках данной ткани показывают, что в опухолевых клетках происходит рекапитуляция (воспроизведение основных этапов) развития клеток этого типа [7], [8]. В процессе развития рака включение и выключение ключевых генов часто происходит в порядке обратном тому, что наблюдается при эмбриогенезе. Это может подтверждать гипотезу, по которой опухоли развиваются в результате трансформации нормальных взрослых стволовых клеток, используемых здоровой тканью для обновления. Рак при таком рассмотрении оказывается не просто генетической болезнью, связанной с накоплением и проявлением мутаций, но и болезнью системы развития той ткани, в которой возникает рак. А гены, в которых накапливаются мутации, - это гены, вовлеченные в развитие данной ткани.

Примером эмбрионального мастер гена, рекапитулирующего в случае канцерогенеза, является фактор SOX2. Транскрипционный фактор SOX2 является главным регулятором, который контролирует плюрипотентность и самообновление эмбриональных стволовых клеток и поддерживает стволовость нервных стволовых клеток [48] [49]. При этом нарушение регуляции экспрессии SOX2 связано с множеством типов рака, и было показано, что SOX2 положительно влияет на такие характеристики раковых клеток, как способность к

пролиферации, миграции, инвазии и метастазированию. Так *SOX2* сверхэкспрессирован при раке молочной железы, кишечника, пищевода, печени, простаты и других видах рака, и для многих его повышенная экспрессия связана с худшим прогнозом [50]. Высокий уровень экспрессии *SOX2* является ключевым фактором для образования раковых стволовых клеток. В исследованиях [51], [52] было показано, что *SOX2*-экспрессирующие опухолевые клетки могут стимулировать злокачественную опухоль, инициирующую и ускоряющую рост опухоли. *SOX2* является маркером раковых стволовых клеток при медуллобластомах и плоскоклеточном раке кожи [53]. Эти свойства делают ген *SOX2* мишенью для воздействия на раковые стволовые клетки. Подавление экспрессии *SOX2* в клетках рака легкого [54], рака молочной железы [53], в глиобластомных клетках [55] и клетках некоторых других видов рака подавляет опухолевый рост и метастазирование. Таким образом, таргетирование мастер регуляторного гена *SOX2* в раковых стволовых клетках может быть сильной терапевтической стратегией для удаления раковых стволовых клеток [53].

Таргетирование раковых стволовых клеток также предлагается осуществлять через воздействие на гены семейства *HOX* [56]. Гены *HOX* являются мастер регуляторами клеточной идентичности и направлений клеточной дифференцировки во время эмбрионального развития, их экспрессия поддерживается во взрослых стволовых клетках по иерархии дифференцировки. Аберрантная экспрессия гена *HOX* обнаруживается при разных видах рака, где они функционируют либо как онкогены, поддерживая пролиферацию клеток, либо как гены-супрессоры опухолей, контролируя дифференцировку клеток. Аномальная экспрессия генов *HOX* участвует в превращении взрослых стволовых клеток в раковые стволовые клетки [56]. Экспрессия *HOX*-генов может влиять на прогноз рака, так как опухоли, обогащенные раковыми стволовыми клетками, имеют худшие исходы у пациента. Связь между экспрессией *HOX* и плохим прогнозом уже установлена для рака молочной железы и аденокарциномы легких (*HOXB7*), почечно-клеточного рака (*HOXC11*), мезотелиомы (*HOXB4*), плоскоклеточного рака полости рта (*HOXD13*), рака желудка (*HOXC6*), рака щитовидной железы (*HOXC10*), рака мочевого пузыря (*HOXB13*) и ОМЛ (*HOXA9*) [57]. Кроме того, профилирование экспрессии *HOX*-генов в циркулирующих раковых стволовых клетках рассматривается в качестве прогностического инструмента для разработки персонализированной терапии [58]. Профили экспрессии *HOX*-генов определяют молекулярные подтипы рака молочной железы, и предполагается, что их экспрессия может быть использована для определения клеточного предшественника различных типов рака и определения клинические решения [59]. Все эти факты делают мастер гены семейства *HOX* потенциальными мишенями для терапии. Так исследователями [57] было осуществлено нацеливание на взаимодействие *HOX*-белков с их

кофакторами PBX или MEIS. Ингибирование комплексов NOX-PBX уже было достигнуто с помощью антагонистического пептида HXR9, который может индуцировать апоптоз при ряде видов рака, включая солидные опухоли молочной железы, простаты, яичников, почек, кожи, легких и опухоли крови, такие как миелома и острый миелоидный лейкоз [57].

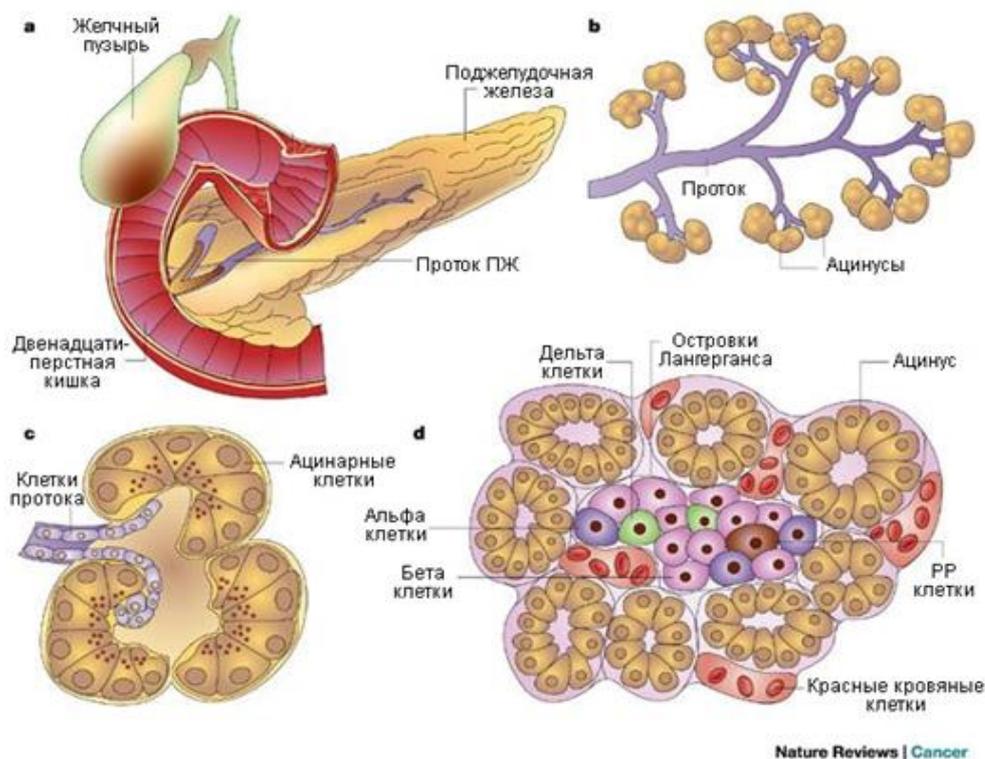
Рассмотрим подробнее эмбриональные мастер гены поджелудочной железы и их потенциальную роль при раке на примере поджелудочной железы.

## **2.3. Мастер гены поджелудочной железы**

### **2.3.1. Строение поджелудочной железы**

Поджелудочная железа является жизненно важным органом, состоящим из двух пространственно обособленных и функционально различных частей – экзокринной и эндокринной области (Рис.3) [60]. Экзокринный компонент составляет около 95% поджелудочной железы взрослого человека. В экзокринную область поджелудочной железы включают компартменты, осуществляющие синтез, секрецию и транспорт пищеварительных ферментов. Экзокринная секреторная область ПЖ состоит из поляризованных секреторных ацинарных клеток, сформированных в ацинусы. Иерархически организованная система протоков ПЖ обеспечивает транспорт продуктов секреции ацинарных клеток в двенадцатиперстную кишку и нейтрализацию желудочного сока за счёт ионов бикарбоната, продуцируемых эпителиальными протоковыми клетками. Эндокринная часть поджелудочной железы состоит из клеток, которые организованы в сильно сосудистые и иннервированные кластеры распространенные по всей поджелудочной железе, называемые островками Лангерганса. Островки Лангерганса содержат пять типов гормон-секретирующих клеток: глюкагон-продуцирующие  $\alpha$ -клетки, инсулин-продуцирующие  $\beta$ -клетки, соматостатин-продуцирующие  $\delta$ -клетки, грелин-продуцирующие  $\epsilon$ -клетки и секретирующие панкреатический полипептид PP-клетки. Гормоны островков ПЖ вовлечены в регуляцию метаболизма многих органов и контроль углеводного гомеостаза организма [60-62].

Таким образом, ПЖ является важнейшим органом внешней и внутренней секреции. Нарушение функций как экзокринной, так и эндокринной ткани этого органа сопровождается тяжелейшими расстройствами пищеварительной системы и гормонального баланса в организме.



**Рис.3.**Строение ПЖ (модифицировано по [62]).

### 2.3.2. Эмбриогенез поджелудочной железы

В процессе эмбриогенеза ПЖ формируется из клеток эктодермы задней части переднего отдела первичной кишки. Развитие ПЖ начинается на стадии 20-25 сомитов эмбриона, что у мыши соответствует примерно 9-9,5 дню эмбрионального развития (E9, dpc, days post coitum). ПЖ развивается из двух зародышевых зачатков (дорсальная и вентральная почки), которые образуются как результат выпячивания клеток эктодермы в окружающую эмбриональную мезенхиму. У мышей дорсальная почка становится морфологически заметной на 9 день эмбрионального развития. Вентральная панкреатическая почка начинает формироваться на стадии 30 сомитов (E9,5-10 у мыши) и имеет несколько отличающуюся программу развития от программы развития дорсальной [63]. На 10 день развития мыши (E10) и на 30-33 день развития человека зародышевая ПЖ состоит из парных почек, которые содержат быстро делящиеся мультипотентные панкреатические клетки-предшественники. В панкреатических почках начинается формирование микрополостей и инициируется процесс их слияния, который приводит к формированию первых протоков. В ходе дальнейшего развития вентральная панкреатическая почка оказывается рядом с дорсальной и сливается с ней благодаря повороту двенадцатиперстной кишки; из вентрального зачатка формируются головка и крючковидный отросток, из дорсальной – тело и хвост железы [63], [64]. Процесс слияния панкреатических почек и образование единого органа начинается на 12 день развития мыши, у человека этот процесс происходит в течение 37-43 дня развития. Начиная со стадии E14 развития эмбриона

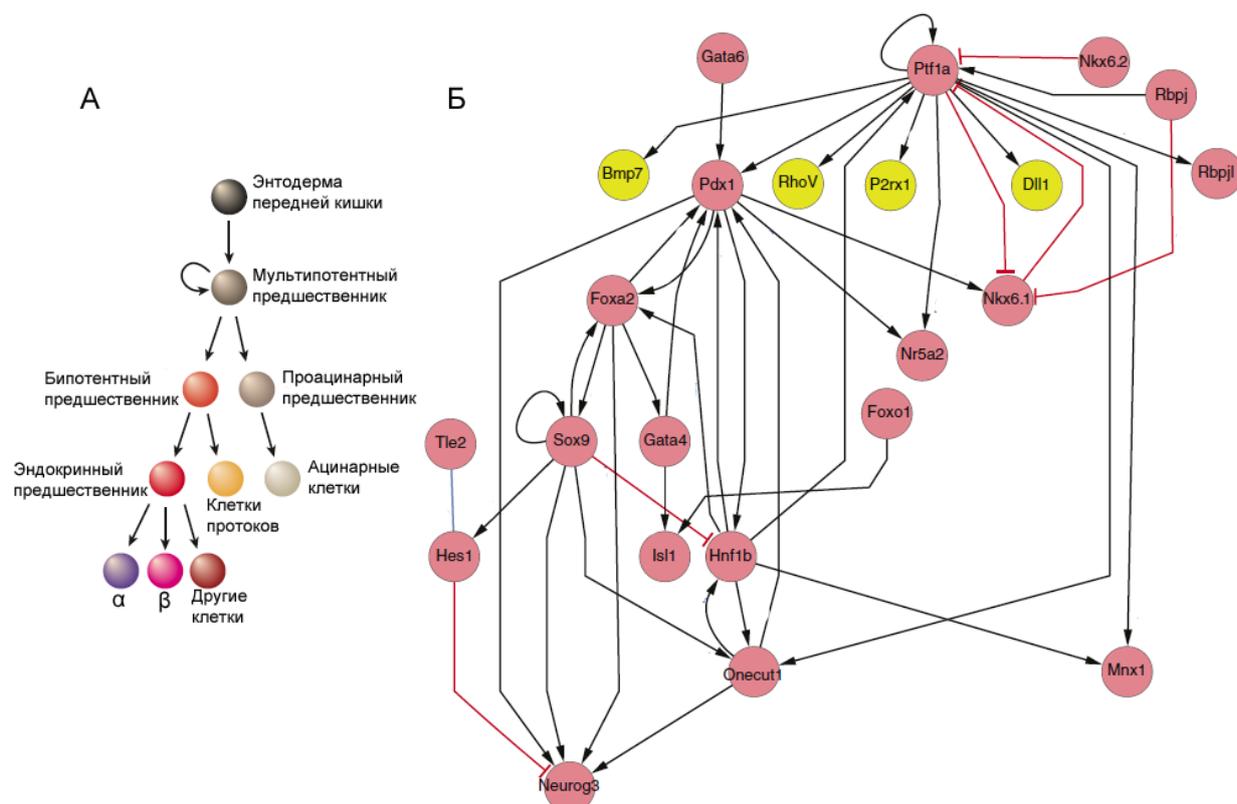
мышы, запускается активное ветвление и ремоделирование протоков, начинается дифференцировка ацинарных клеток, формируется пул бипотентных клеток- предшественников и инициируется процесс обособления (деламинации) эндокринных клеток-предшественников. Рост и окончательное созревание экзокринной и эндокринной областей ПЖ происходит в постнатальный период. Весь эмбриональный органогенез ПЖ происходит как постоянный процесс взаимодействия между растущим эпителием железы и окружающими клетками эмбриональной мезенхимы [65].

Дифференцировка клеток и выполняемые ими функции, характерные для определенных органов и тканей, главным образом определяются активностью тканеспецифических генов. Поэтому механизмы, контролирующие активность специфических функциональных генов, играют значительную роль как в развитии тканей во время эмбриогенеза и поддержании их нормального функционирования во взрослом состоянии, так и в процессах возникновения и прогрессии злокачественных образований. Большая часть этих механизмов работает на уровне транскрипции и представлена транскрипционными факторами. Тщательно скоординированное включение и выключение экспрессии различных трансфакторов задает программу работы клетки в определенные периоды онтогенеза. Наибольшее значение имеют мастер регуляторные транскрипционные факторы, регулирующие экспрессию большого числа генов, характерных для данного периода жизнедеятельности клетки (в том числе кодирующих другие регуляторы). Нарушение функций мастер гена может приводить к комплексным изменениям физиологических и биохимических свойств клетки; активация же в клетках транскрипционных факторов, в норме характерных для другой ткани, может привести к частичному приобретению этими клетками фенотипа данной ткани – это явление известно под названием транс-дифференцировки [66]. Так, экзогенная экспрессия фактора PDX1, специфического для панкреатических клеток, в клетках печени приводит к активации в них промотора гена инсулина, специфичного для  $\beta$ -клеток ПЖ [67].

### **2.3.3. Сети генных взаимодействий, координирующие эмбриогенез поджелудочной железы**

В начале развития поджелудочной железы клетки задней части энтодермы кишечника формируют зачаток поджелудочной железы (Рис. 4А). Исследования предполагают, что выбор клеток осуществляется через пути передачи внутриклеточных сигналов от ростовых факторов, в частности, FGF, TGF- $\beta$  [68], а также с помощью регуляции хроматина по Ezh2 и гистонацетилтрансферазе p300 [69]. Кроме того, коэкспрессия факторов Ptf1a и Pdx1 может являться необходимой для коммитирования клеток энтодермы кишечника в предшественники поджелудочной железы [70, 71]. Возможно, для формирования нового направления развития,

необходимы оба этих условия. Новое «состояние» клеток-предшественников стабилизируется петлей позитивной обратной связи, включающей ауторегуляцию *Ptf1a* и индукцию фактором *Ptf1a* экспрессии *Pdx1* в клетках-предшественниках поджелудочной железы [71, 72]. Дефицит какого-либо из этих факторов приводит к серьезным порокам развития поджелудочной железы, включая агенез [73]. Аналогично, потеря экспрессии *Hnf1b* [74], *Gata4* и *Gata6* [75] также приводит к частичному или полной агенезу поджелудочной железы.



**Рис.4. А.** Направления дифференцировки клеток предшественников поджелудочной железы мыши. **Б.** Сеть регуляторных взаимодействий генов. По [76]

После формирования из дорсальной и вентральной энтодермы зачатков поджелудочной железы на стадии E11,5 мультипотентные клетки-предшественники (Рис.4) экспрессируют факторы *Ptf1a*, *Pdx1*, *Sox9*, *Hnf6* и *Nkx6.1* [77]. Далее дифференцировка этих клеток, экспрессирующих  $Sox9^+Pdx1^+Ptf1a^+Nkx6^+$ , может пойти по двум направлениям (Рис.4): 1) в экзокринные проацинарные клетки, экспрессирующие *Ptf1a* и *Rbpj* или 2) в бипотентные *Nkx6.1*-позитивные клетки, которые в последствии сформируют образуют экзокринные клетки протоков, экспрессирующие *Sox9*, или эндокринные клетки-предшественники, экспрессирующие *Neurog3* [72]. Взаимоисключающая экспрессия *Ptf1a* и *Nkx6.1* и *Nkx6.2*

регулирует дифференцировку мультипотентного панкреатического предшественника по одному из этих путей [78].

В проацинарных клетках *Ptf1a* взаимодействует с фактором *Rbpj*. *Ptf1a* и *Rbpj* в комплексе индуцируют экспрессию *Rbpjl*, конститутивно активного, ограниченного поджелудочной железой паралога *Rbpj*. По мере созревания ацинарных клеток *Rbpjl* заменяет *Rbpj* в комплексе РТF1 и также ассоциируется с промоторами других ацинарноспецифических генов, включая кодирующие гены экзокринные пищеварительные ферменты [72, 79]. Таким образом, созревание ацинарной клетки регулируется с помощью позитивной петли обратной связи, которая регулируется динамическим транскрипционным комплексом РТF1 (Рис. 4).

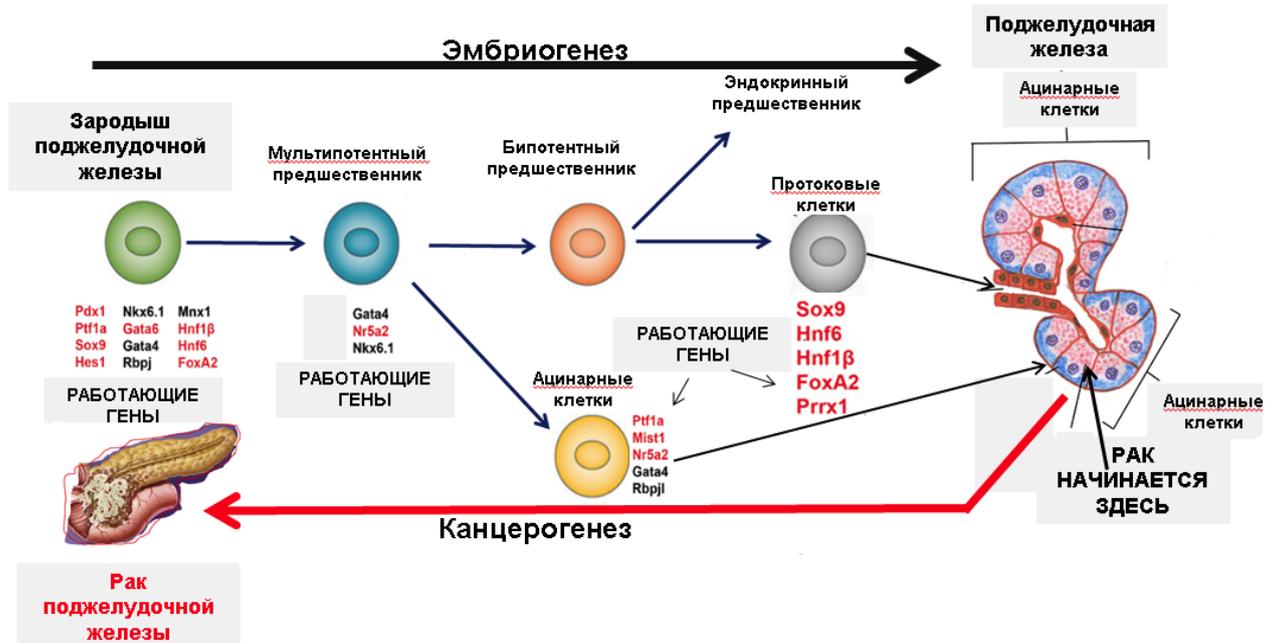
Дифференцировка бипотентных *Sox9<sup>+</sup>Nkx6.1<sup>+</sup>*-позитивных клеток в протоковые и *Neurog3<sup>+</sup>*-позитивные эндокринные предшественники. Предположительно, ключевую роль в выборе направления дифференцировки играет уровень экспрессии гена *Neurog3*: для включения эндокринной программы экспрессия *Neurog3* должна преодолеть некоторое пороговое значение [80, 81]. При этом, развитие *Neurog3*-экспрессирующих клеток по эндокринному пути обратимо: потомки бипотентных предшественников, в которых экспрессируется нулевой аллель гена *Neurog3* остаются внутри эпителия, а затем приобретают проточный или ацинарный клеточный фенотип [80, 81]. При дифференцировке бипотентных предшественников фактор *Sox9* активирует *Neurog3* и *Hes1*, являющийся репрессором экспрессии *Neurog3*, кроме того *Neurog3* может ауторегулировать экспрессию собственного гена [82]. *Neurog3<sup>+</sup>*-позитивные клетки не делятся, экспрессируются *Cdkn1a* [83] и приобретают мезенхимальные черты, в частности, способность мигрировать и образовывать островки. Экспрессия *Neurog3* может влиять на тип генерируемой эндокринной клетки: экспрессия *Neurog3* активируется сначала в  $\alpha$ -клетках, после – в  $\beta$ -эндокринных клетках, затем в  $\delta$  и РР. Сети генных взаимодействий, регулирующие эти процессы могут включать гены *Neurog3*, *Nkx2.2*, *Pax4* и *Arx*. Основным элементом в этой сети является прямая взаимная репрессия гомеодоменными факторами *Pax4* и *Arx*. Факторы *Mafk*, *Mafa*, *Isl1* и *Pdx1* также являются важными детерминантами дифференцировки  $\alpha$  и  $\beta$ -клеток [76].

#### **2.3.4. Мастер регуляторы развития и канцерогенеза поджелудочной железы**

Мастер-регуляторы, выявленные при исследованиях процессов эмбриогенеза поджелудочной железы, являются кандидатами на роль ключевых генов, ответственных за инициацию и прогрессию ПАПЖ. При этом важно иметь в виду, что вероятно, мастер факторы выполняют свою роль, взаимодействуя друг с другом.

На Рис. 5 показано, как близко перекрываются мастер-регуляторы, участвующие в развитии и раке поджелудочной железы. Использование одних и тех же генов и регуляторных

сетей при эмбрио- и канцерогенезе дает основание надеяться, что выявление элементов этих сетей в любом из этих процессов позволит дополнить недостающие звенья в понимании механизмов другого. Эти данные получены на мышинных или клеточных моделях. Существуют ли мастер гены, рекапитулирующие при раке поджелудочной железы человека не ясно. Среди таких потенциальных мастер генов, дерегулированных у человека, мы выделили потенциальные мастер регуляторные гены *PDX1*, *PTF1A*, *SOX9*, *GATA4* и *HNF1b*.



**Рис.5.** Перекрывание генов, экспрессирующихся на разных стадиях эмбриогенеза поджелудочной железы и при аденокарциноме поджелудочной железы (модифицировано по [84], [85]). Красным выделены гены, вовлеченные и в эмбрио- и в канцерогенез поджелудочной железы.

### *PDX1*

Транскрипционный фактор *PDX1* (Pancreatic and Duodenal homeoboX gene 1) является членом семейства транскрипционных факторов ParaNox, экспрессия которых наблюдается в клетках поджелудочной железы и двенадцатиперстной кишки. *PDX1* является основным регуляторным фактором как эмбрионального развития поджелудочной железы в целом, так и дифференцировки клеток-предшественников в бета-клетки островков Лангерганса [16], [86]. В процессе формирования органа экспрессия *PDX1* в различных клетках сильно меняется в зависимости от стадии развития. В ходе развития поджелудочной железы экспрессия *PDX1* постепенно ослабевает, а затем и полностью исчезает в клетках экзокринной части, но сохраняется в бета-клетках эндокринной части [86]. Экспрессия *PDX1* частично сохраняется в

протоковых клетках поджелудочной железы, но ее уровень относительно низок по сравнению с бета-клетками. Во взрослом организме PDX1 играет ключевую роль в поддержании и функционировании бета-клеток. PDX1 регулирует транскрипцию генов гормонов инсулина, соматостатина, глюкагона, *IAPP* (островковый амилоидный полипептид), а также генов, транскрипция которых зависит от концентрации глюкозы, например,  $\beta$ -глюкокиназы, *Kir 6.1* (АТФ-зависимый  $K^+$ -канал, вовлеченный в секрецию инсулина), *Glut2* [87].

В норме экспрессия *PDX1* наблюдается в основном в эндокринной части ПЖ, в клетках островков Лангерганса и центроацинарных клетках [88]. В поджелудочной железе взрослого человека экспрессия *PDX1* вне островков Лангенгарса наблюдается при регенерации [89], панкреатите [90], после панкреатэктомии и при многих патологических состояниях, которые включают реактивацию эмбриональных сигнальных путей, например при раке и при повреждении ПЖ. Экспрессия *PDX1* наблюдается в 40% случаев интраэпителиальной неоплазии поджелудочной железы, в 35% случаев внутрипротоковой папиллярно-муцинозной опухоли, в двух из трех случаев муцинозных кистозных новообразований поджелудочной железы [88].

Показано, что у пациентов с такими онкологическими заболеваниями как рак груди, простаты, толстой кишки и рак почек происходит одновременное увеличение экспрессии *PDX1* в нормальных и опухолевых тканях [91], тогда как у здоровых людей экспрессия *PDX1* не детектируется. Показано, что сверхэкспрессия *PDX1* наблюдается при инсулиноме, нейроэндокринных опухолях и раке поджелудочной железы [92]. Однако не было найдено достоверной корреляции между уровнем экспрессии *PDX1* и выживаемостью пациентов [88].

Предполагается, что PDX1 может обладать онкогенным потенциалом, поскольку он способен стимулировать клеточную пролиферацию, ингибирование апоптоза и усиление клеточной инвазии [92],[89]. При сверхэкспрессии *PDX1* наблюдается стимуляция экспрессии циклинов D1 и E, и циклин-зависимых киназ *CDK2* и *CDK4*, и пониженная экспрессия *p21*, *p27* и *p53*. Что может указывать на роль PDX1 в промотировании перехода клеточного цикла от стадии G1 к S. [93].

В процессе канцерогенеза поджелудочной железы PDX1 меняет свою функцию по меньшей мере трижды: 1) PDX1 – опухолевый супрессор: PDX1 критичен в сохранении идентичности ацинарных клеток и препятствовании образованию панкреатической интраэпителиальной неоплазии (PanIN). 2) Канцерогенная роль: при неопластической трансформации PDX1 стимулирует пролиферацию клеток и ингибирует апоптоз; 3) Супрессор эпителиально-мезенхимального перехода: в процессе эпителиально-мезенхимального перехода прекращается экспрессия гена PDX1, и начинается метастазирование [16],[94].

Это изменение функциональности от стадии к стадии, по-видимому, вызывается серьезными изменениями в эпигенетическом контексте участков связывания PDX1 с хроматином на разных стадиях опухолевой прогрессии. Так, существует лишь минимальное перекрытие между областями генома, которые связываются с PDX1 в нормальных ацинарных и клетках протоковой аденокарциномы. Это означает, что PDX1 регулирует различные наборы генов в первичных и трансформированных клетках. В частности, в ацинарных клетках PDX1 взаимодействует с генами, связанными с дифференциальным состоянием ацинарных клеток (например, *CELA1*, *CELA2*, *CPA2* и *AMY1*) и с эмбриональным развитием и дифференцировкой эпителиальных клеток (например, *NR5A2*, *FOXA2* и *ONECUT1*). В опухолевых клетках PDX1 связан с генами, вовлеченными в канцерогенез, в том числе в эпителиально-мезенхимальный переход и клеточный ответ на TGF- $\beta$  сигнал. С различиями функций согласуются также данные, показывающие, что области генома, с которыми связывается PDX1 в ацинарных клетках, обогащены сайтами связывания транскрипционных факторов, определяющих нормальное дифференцированное состояние поджелудочной железы, таких как HNF4A, NKX6.1, HNF1A и HNF1B. Напротив, в некоторых клетках протоковой аденокарциномы поджелудочной железы участки, взаимодействующие с PDX1, обогащены мотивами онкогенных факторов транскрипции, таких как GSC2, PRRX2, STAT5, C-JUN и C-FOS. Экспрессия генов, регулируемых PDX1, значительно отличается между ацинарными и опухолевыми клетками [94].

### ***PTF1a***

Панкреатический транскрипционный фактора PTF1A (Pancreas Specific Transcription Factor 1a), принадлежит к семейству bHLH транскрипционных факторов, содержащих структурный мотив «спираль-петля-спираль» обычно связывающийся с гескануклеотидным сайтом последовательности E-боксов [95]. PTF1A формирует тримерный комплекс PTF1, в состав которого входят ядерный медиатор Notch-сигнального пути RBPJк (Recombination signal-binding protein Jк), участвующий в ремоделировании хроматина, и E-белок. В составе транскрипционного комплекса PTF1 димер PTF1A/E-белок распознает E-боксы, а RBPJк – TC-боксы в регуляторных последовательностях генов-мишеней. Комплекс PTF1 играет ключевую роль в процессах эмбрионального развития поджелудочной железы, спинного мозга, мозжечка и сетчатки глаза.

Первоначальная функция PTF1A заключается в выборе направлений развития зародышевой кишки в поджелудочную железу, двенадцатиперстную кишку и желчные пути. Кроме того, PTF1A необходим для ацинарной дифференциации клеток. Ауторегуляция Ptf1a комплексом PTF1, поддерживающая уровень экспрессии *Ptf1a*, играет важную роль в

окончательном созревании ацинарных клеток и необходима в дальнейшем для поддержания их фенотипа и функций. Во взрослом организме *PTF1A* экспрессируется только в ацинарных клетках поджелудочной железы и в составе комплекса PTF1 активирует транскрипцию генов пищеварительных ферментов, таких как эластаза 1, амилаза, химотрипсиноген В, карбоксипептидаза А и трипсин [72].

Ptf1a участвует в сложной системе взаимодействий транскрипционных факторов, определяющих развитие мультипотентных панкреатических предшественников в разные типы клеток поджелудочной железы, и необходим для активации экспрессии ряда транскрипционных регуляторов. Так, например, PTF1A связывает промотор гена *MNX1* и запускает его экспрессию [96], вовлеченного в дифференцировку эндокринных клеток островков Ларгенганса в  $\beta$ -клетки [97]. Ptf1a способен индуцировать экспрессию гена *Pdx1*, взаимодействуя с консервативным участком III в промоторе гена этого транскрипционного фактора [71]. Сочетание эктопической экспрессии Ptf1a и Pdx1 в не панкреатических энтодермальных клетках приводит к преобразованию их в клетки-предшественники поджелудочной железы [70]. Транскрипционный фактор *Onecut1* также находится под контролем Ptf1a [96]. Белок *Onecut1* способен запускать экспрессию гена *Pdx1* и играет важную роль в созревании  $\beta$ -клеток [98].

Посредством взаимодействия между Ptf1a и Delta-Notch-сигнального пути осуществляется регуляция эндокринной дифференцировки клеток. Ptf1a является важным активатором транскрипции дельта-подобного лиганда 1 *Dll1* (Delta-like 1), первого экспрессирующегося в поджелудочной железе лиганда рецептора Notch в панкреатических мультипотентных клетках-предшественниках. При этом *Dll1* необходим для формирования эндокринного фенотипа, а Notch-сигнализация индуцирует пролиферацию клеток [99].

Одним из транскрипционных активаторов в процессах эмбрионального развития *Ptf1a* может являться  $\beta$ -катенин – канонический медиатор Wnt-сигнального пути, играющий важную роль в формировании экзокринной части поджелудочной железы. Инактивация Wnt-сигналинга или нокаут гена  $\beta$ -катенина у мышей приводят к значительному снижению уровня экспрессии *Ptf1a* и сокращению ацинарной дифференцировки [100]. Также возможным регулятором транскрипции гена *Ptf1a* может являться киназа печени плода Flk1 (Fetal Liver Kinase 1, Kinase insert domain receptor, KDR), являющаяся рецептором к фактору роста эндотелия сосудов VEGF. У мутантных мышей с инактивированным геном *Flk1* не происходит индукция транскрипции *Ptf1a*, а также не развиваются эндотелиальные клетки и дорзальная часть поджелудочной железы [101].

Негативными регуляторами транскрипции *Ptf1a* являются гомеобоксные транскрипционные факторы Nkx6.1 и Nkx6.2, стимулирующие дифференцировку клеток по

эндокринному пути [78]. *Ptf1a* выполняет функцию антагониста этих белков и, в свою очередь, подавляет их экспрессию в предшественниках ацинарных клеток.

Было показано, что на ранних стадиях развития рака поджелудочной железы происходит потеря экспрессии *Ptf1a* из-за препятствующего образованию комплекса РТF1 ингибитора ДНК-белкового связывания Id3 [102]. Id3 белок является онкогеном и сверхэкспрессируется в ответ на митогенный сигнал. Он разрушает комплекс Ptf1-p48 с E-белком, взаимодействуя с E47 и Ptf1a субъединицами транскрипционного фактора РТF1 [102]. Кроме того, на взаимодействие между белками, формирующими комплекс РТF1, влияет ICAT (Inhibitor of  $\beta$ -catenin and Tcf4, ингибитор  $\beta$ -катенина и Tcf4), который сверхэкспрессируется в ацинозных опухолевых клетках [103].

### ***SOX9***

*SOX9* принадлежит к семейству транскрипционных факторов SOX (SR $\gamma$ -подобные гены с HMG-боксом). *SOX9* выполняет множество функций как во время эмбриогенеза, так и во взрослом организме, среди которых поддержание недифференцированного фенотипа клеток и их способности к пролиферации [104].

В процессе развития поджелудочной железы мыши *Sox9* начинает экспрессироваться на E9 и коликализуется с экспрессией *Pdx1* в вентральной и дорзальной поджелудочной почках [77]. Экспрессия *Sox9* продолжается в большинстве эпителиальных *Pdx1*-позитивных клетках на стадиях E10.5-E12.5. На E14 *Sox9* экспрессия ограничена субпопуляцией *Pdx1*-позитивных клеток, находящихся в центре. Там Notch-чувствительные пролиферирующие клетки-предшественники образуют мигрирующие *Ngn3*-позитивные эндокринные предшественники. *SOX9*-позитивные клетки экспрессируют многочисленные маркеры эндокринных предшественников, включающих *NGN3*, *FOXA2*, *NKX2.2*, *NKX6.1*, и *PAX6*, но при этом экспрессия *SOX9* отсутствует в зрелых эндокринных клетках [105], [106]. На поздних стадиях развития (> E18.5) экспрессия *SOX9* ограничена протоковыми эпителиальными клетками.

Мозаичное удаление *Sox9* из клеток *Pdx*-позитивных клеток приводило к уменьшению экспрессии *Pdx1* на E12.5, что указывает на то, что *Sox9* участвует в регуляции экспрессии гена *Pdx1* [107].

Существуют данные, свидетельствующие о том, что *Ptf1a*<sup>+</sup>*Sox9*<sup>+</sup>*Hnf1b*<sup>+</sup>-позитивные клетки образуют возможный мультипотентный пул клеток предшественников, который присутствует в эпителии поджелудочной железы. При низкой экспрессии *Sox9* в этих клетках дифференцировка может пойти по ацинарному пути. При высокой экспрессии *Sox9* и *Hnf1b* в

поджелудочной железе дифференцировка клеток-предшественников идет по эндокринному или протоковому пути [45].

Экспрессирующие *SOX9* протоковые и центрoацинарные клетки, расположенные в участке между протоковыми и ацинарными клетками, отвечают за поддержание гомеостаза экзокринной части ПЖ [108]. Также для *SOX9* была показана его связь с процессом регенерации ПЖ при повреждениях [109]. Известно, что ацинарные клетки могут быть активированы, вследствие восстановления органа после травмы, и становиться вновь *Ptf1a<sup>+</sup>Sox9<sup>+</sup>Hnf1b<sup>+</sup>*-позитивными клетками, которые могут быть подвергнуты ацинарно-протоковой метаплазии [45]. Активация онкогенной мутации в гене *KRAS* в таких клетках способствует образованию предраковых состояний PanIN.

В процессе ацинарно-протоковой метаплазии критически важен фактор *Sox9*. Индукция *Sox9* в экспрессирующих *KrasG12D* ацинарных клетках предшествует ее инициации и развитию PanIN [47]. Факторы *Sox9* и *Onecut1* экспрессируются в метапластических ацинарных клетках в непосредственной близости от опухолевых очагов. Показано, ацинарно-протоковая метаплазия притупляется специфической делецией *Sox9* в ацинарных клетках и обратное также верно: экспрессия *Sox9* в экспрессирующих *KrasG12D* ацинарных клетках ускоряет образование ацинарно-протоковой метаплазии и состояний PanIN [47].

Экспрессия *SOX9* повышена во многих типах опухолей. В ранее проведенных исследованиях влияния TGF $\beta$ -сигнального каскада на *SOX9* было выявлено как увеличение, так и снижение уровня его экспрессии в разных типах клеток. Кроме того, показано, что сверхэкспрессия *SOX9* может промотировать ЭМП [76].

При запуске ацинарно-протоковой метаплазии происходит активация факторов транскрипции *SOX9*, *Pdx1*, *Hnf6*, *Hnf1 $\beta$* , *Hes1*, чья экспрессия характерна для бипотентных клеток предшественников [104], [110], [111]. Активация *SOX9* в ацинарных клетках необходима для начальной фазы развития опухолей поджелудочной железы. После активации *KRAS* происходит инактивация фактора p27 — репрессора гена *SOX9* [110] и запускается NF $\kappa$ B-сигнальный путь, способствующий активации гена *SOX9* [74]. Дополнительным фактором активации *SOX9* при мутациях *Kras* может выступать и активация гена *KLf5* [70]. Мутации гена *Kras* в ацинарных клетках являются пусковым механизмом для АПМ, но этого оказывается недостаточно для возникновения ПАПЖ. Для индукции канцерогенеза необходимы возникающие на фоне хронического панкреатита воспалительные сигналы, которые включают сигнальный путь EGFR [64, 75], приводящий к экспрессии гена *NFATc4*, являющегося активатором гена *SOX9* [76, 77]. В свою очередь *SOX9* активирует экспрессию гена *ERBB2*, являющегося следующим звеном EGFR-сигнального пути [78]. Помимо этого,

непосредственным индуктором экспрессии гена *Sox9* может выступать изоформа В фактора *Prrx1*, активация которой происходит и при остром панкреатите, и при мутациях *Kras* [79]. Таким образом, ПАПЖ возникает вследствие комбинации генетических (мутация *Kras*) и негенетических (повреждение ткани) причин [64], совместное действие которых приводит к активации гена *SOX9*. Как видно, *SOX9* является необходимым элементом для начальной фазы ПАПЖ, при этом стоит отметить, что *SOX9* не может служить надежным маркером для дифференциации хронического панкреатита и ПАПЖ, но может служить маркером протокового типа неоплазии ПЖЖ [49].

### ***GATA4***

Семейство факторов транскрипции GATA состоит из шести белков (GATA1-6), которые относятся к семейству цинковых пальцев и участвуют в различных физиологических и патологических процессах. Факторы GATA1/2/3 необходимы для дифференцировки мезодермальных и эктодермальных тканей, включая кроветворную и центральную нервную системы. GATA4/5/6 вовлечены в развитие и дифференцировку энтодерм - и мезодерм-производных тканей, индукцию дифференцировки эмбриональных стволовых клеток, сердечно-сосудистый эмбриогенез и управляют дифференцировкой эпителиальных клеток взрослого человека [112].

На ранних стадиях развития поджелудочной железы экспрессия фактора *Gata4* перекрывается с экспрессией другого важного регулятора развития этого же семейства - *Gata6*, но постепенно ограничивается экзокринным компартментом ПЖ, в то время как *Gata6* преимущественно экспрессируется в эндокринном компартменте [112]. Коэкспрессия факторов GATA4 и GATA6 отмечена во внезародышевых энтодермальных клетках, включающих висцеральную и париетальную энтодерму. Известно, что мутантные по *GATA4* мыши к 9 эмбриональному дню (E9) погибают из-за пороков морфогенеза сердца. Исследователями [113] было продемонстрировано, что одновременное удаление *Gata4* и *Gata6* из клеток-предшественников поджелудочной железы приводит к агенезу поджелудочной железы у новорожденных мышей. Важность GATA4 в развитии поджелудочной железы человека также была подчеркнута в сообщении о генетических случаях агенеза поджелудочной железы человека: гаплонедостаточность *GATA4* была задокументирована у небольшого числа пациентов с агенезом поджелудочной железы [114].

Критическая роль факторов семейства GATA в дифференциации экстраэмбриональной энтодермы также были продемонстрированы с помощью сверхэкспрессии *GATA4* и *GATA6* в эмбриональных стволовых клетках [115]. Было обнаружено, что экспрессии этих факторов было достаточно, чтобы вызвать дифференцировку клеток во внезародышевую энтодерму и

подавлению идентичности стволовых клеток, о чем свидетельствует активация гена маркера энтодермы *Hnf3 $\beta$* , повышенная регуляция париетальной энтодермы маркерные гены *Sparc*, ламинин B1, *tPA* и *Dab2*, и снижение уровня *Oct4* и *Sox2* [115]. На модели *in vivo* рыбок данио, было установлено, что гены *GATA4* и *GATA6* имеют четкие и не избыточные функции в развитии сердца, а также в развитии кишечника, печени и поджелудочной железы [116].

Во взрослой поджелудочной железе *GATA4* экспрессируется как в ацинарных клетках, так и в клетках эпителия протоков ПЖ [117]. Данные полученные на мышинной модели [118] и данные по экспрессии этого гена в тканях человека [117] свидетельствуют о меньшей экспрессии *GATA4* в эпителии протоков по сравнению с ацинарными клетками и частично отражают относительно большую роль *GATA4* в поддержании ацинарного компартмента взрослой ПЖ.

Данные [119] указывают на то, что ген *GATA4* может играть роль в пролиферации и дифференцировке клеток во время прогрессирования рака поджелудочной железы. Исследователями было показано, что в тканях рака поджелудочной железы обнаруживается высокий уровень экспрессии гена *GATA4*, и его уровень экспрессии был положительно связан со степенью патологической дифференцировки клеток, что позволяет предположить, что он может способствовать прогрессированию неоплазии поджелудочной железы. Эктопическая экспрессия гена *GATA4* снижала жизнеспособность клеток, а подавление экспрессии *GATA4* значительно увеличивала способность образовывать колонии раковых клеток поджелудочной железы. Кроме того, [119] показано, что *GATA4* ингибировал рост опухоли у мышей с ксенотрансплантными опухолями.

Увеличение содержания мРНК гена *GATA4* показано [120]. В этом же исследовании отмечено, что повышенный уровень *GATA4* является особенностью инфильтрированной аденокарциномы ПЖ по сравнению с нормальным эпителием протоков ПЖ [120]. В исследовании [117] было обнаружена потенциальная взаимосвязь экспрессии *GATA4* и пола человека: более высокий уровень экспрессии был отмечен при раке ПЖ у женщин. При этом известно, что *GATA4* участвует в развитии гонад.

### ***HNF1 $\beta$***

Гепатоцитарный ядерный фактор -1 бета (*HNF1B*) был первоначально обнаружен как специфичный для печени фактор транскрипции. *HNF1B* – это гомеобоксный транскрипционный фактор, который функционирует как гомодимер или гетеродимер с *HNF1a* [121]. Гепатоцитарные ядерные факторы (*HNF*) представляют собой группу факторов транскрипции, которые играют важную роль в регуляции транскрипции специфических для печени генов. *HNFs* экспрессируются как в печени, так и во многих других органах, и образуют

сложную сеть, регулирующую развитие печени и дифференцировку гепатоцитов. Тем не менее, печень является единственной тканью, в которой значительное количество различных HNF экспрессируется одновременно [122]. Среди этих факторов HNF1 $\beta$  является одним из наиболее важных во время развития и онкогенеза.

Ген *HNF1 $\beta$*  (TCF2) расположен на хромосоме 17q12 [123]. Первое описание мутаций *HNF1 $\beta$* , связанных с заболеванием, было в 1997 году. У людей гетерозиготные мутации зародышевой линии в HNF1 $\beta$  вызывают сахарный диабет взрослого типа у молодых (диабет типа Mason), более известный как MODY-диабет молодого возраста, 5 подтипа (MODY5), который связан с врожденными аномалиями, включая поликистоз почек, аномальные гениталии тракт и тяжелая гипоплазия поджелудочной железы [124].

Было обнаружено, что последовательный транскрипционный каскад *Hnf1b*  $\rightarrow$  *Hnf6*  $\rightarrow$  *Pdx1* направляет дифференцировку энтодермальных клеток в предшественники поджелудочной железы [125],[126]. Со стадии E14.5 до зрелого возраста мыши экспрессия *Hnf1b* ограничена эмбриональными протоковыми связками, которые позже образуют клетки взрослых протоков [127],[128]. Было показано, что *Hnf1b*-дефицитные мышинные эмбрионы, проявляют агенезию поджелудочной железы с транзитной дорсальной почкой, экспрессирующей *Pdx1*, что указывает на то, что *Hnf1b* необходим для спецификации поджелудочной железы [127]. *Hnf1b*-дефицитные эмбрионы также обнаруживают нарушение развития других органов, происходящих из вентральной энтодермы, включая печень [129]. Анализ направлений дифференцировки клеток выявил, что позитивные по *Hnf1b* эмбриональные клетки ветвящейся поджелудочной железы являются предшественниками ацинарных, протоковых и эндокринных линий [126, 130].

Во взрослом организме сильная экспрессия *HNF1 $\beta$*  характерна для всей желчной системы, а также в экзокринных протоках поджелудочной железы и почечных канальцах [131]. Экспрессия *HNF1 $\beta$*  также наблюдается в перипортальных гепатоцитах, тимусе, половых путях, легких и кишечнике [131],[132]. HNF1 $\beta$  участвует в эмбриональном развитии и метаболизме почек, поджелудочной железы, печени и желчевыводящей системы. Недавние исследования показали, что экспрессия *HNF1 $\beta$*  связана с риском развития рака в нескольких опухолях, а HNF1 $\beta$  играет важную роль в онкогенезе [121].

Постнатальная инактивация *HNF1 $\beta$*  в панкреатических протоках приводит к хроническому панкреатиту у взрослых [133]. Мутанты *Hnf1b $\Delta$ duct* проявляют дилатацию протоков, потерю ацинарных клеток, ацинарно-протоковую метаплазию и липоматоз, развивающуюся панкреатическую интраэпителиальную неоплазию с переходом совместно с KRAS.

В поджелудочной железе  $HNF1\beta$  является маркером для выявления светлоклеточных карцином рака, и его чрезмерная экспрессия может предсказать худшую выживаемость [134]. Среди других типов рака показана экспрессия  $HNF1\beta$  в ~ 77% светлоклеточных карцином почек и яичников, аденокарциномы желудочно-кишечного тракта, легких и предстательной железы также иногда позитивны по экспрессии  $HNF1\beta$  [135]. В работе [136]  $HNF1\beta$  идентифицирован как трансформирующий онкоген, необходимый для выживания раковых клеток. Тем не менее, другое исследование [137] показало, что  $HNF1B$  может функционировать в качестве гена-супрессора опухолей при канцерогенезе почек посредством контроля экспрессии  $PKHD1$ . Было доказано [138], [139], что  $HNF1B$  подавляется в клетках яичников, желудка, поджелудочной железы и ободочной и прямой кишки, и его подавление влияет на клеточные фенотипы, связанные с опухолевыми свойствами в клетках рака предстательной железы [140].

Аберрантная экспрессия  $HNF1\beta$  в опухолях связана с эпигенетическими процессами и эпигенетическими изменениями. Эпигенетическая инактивация  $HNF1\beta$  также наблюдается в клеточных линиях рака ободочной и прямой кишки, желудка и поджелудочной железы, что предполагает участие эпигенетической инактивации  $HNF1\beta$  в онкогенезе [141]. Известно, что мутации  $HNF1\beta$  влияют на экспрессию нижестоящих генов, таких как  $HNF4\alpha$ ,  $PKHD1$  и  $UMOD$  [141].

### **3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ МАТЕРИАЛЫ**

#### **3.1. Материалы**

##### **Реактивы**

В работе были использованы следующие реактивы.

Акриламид, персульфат аммония, пероксид водорода, хлорид магния, хлорид кальция, борная кислота - фирма «Merck» (Германия).

Агароза (High Strength Analytical Grade Agarose), бис-акриламид, тетраэтилметилендиамин (ТЕМЕД), люминол - «Bio-Rad» (США).

Агароза (LE 2, For nucleic acid gel electrophoresis) - «Helicon» (Россия).

β-меркаптоэтанол - «Promega» (США).

Глицерин, трис - (-оксиметил-аминометан) - «Sigma» (США).

Твин-20 - «FERAK» (Германия).

Липофектамин 2000 - «Invitrogen» (США).

Дезоксинуклеозидтрифосфаты, этидий бромид, ксиленцианол, бромфеноловый синий, додецилсульфат натрия, ЭДТА - фирма «Amersham Pharmacia Biotech» (Англия).

Изопропанол, этанол, хлорид натрия, ацетат аммония, ацетат натрия, гидроксид калия, этиловый спирт, изоамиловый спирт, фенол, хлороформ, метанол - марки «хч» или «осч» фирма «Реахим» (Россия).

Ампициллин, сульфат канамицина - «Синтез» (Россия).

Глицин, сухое молоко (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk) - «Bio-Rad» (США).

##### **Ферментные препараты**

Эндонуклеазы рестрикции EcoRI, BamHI, NcoI, NotI, HindIII, SalI, SmaI, PmeI, PstI, MluI, PvuII, XhoI, XbaI – Thermo Fisher Scientific, США

T4 ДНК лигаза, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, SAP (щелочная фосфатаза креветки) - Thermo Fisher Scientific, США

Готовая смесь для ПЦР ScreenMix, Готовая смесь для ПЦР qPCRmix-HS SYBR – Евроген, Россия

Трипсин с ЭДТА – Invitrogen, США

##### **Антитела**

Мышинные моноклональные к GAPDH (SC-47724), мышинные моноклональные к PTF1a (SC-393011), GATA-4 (SC-25310), Cytoteratin 8 (SC-8020), кроличьи поликлональные к SOX9 (SC-20095), Vimentin (SC-5565), E-cadherin (SC- 7870), козлиные поликлональные к HNF3b (FOXA-2) (SC-s6554); поликлональные овечьи антитела к мышинным IgG (SC-2302), к кроличьим IgG (SC-2301), к козлиным IgG (SC-2020), конъюгированные с пероксидазой хрена - Santa Cruz Biotechnology, США.

Мышинные моноклональные к SNAIL (#3895), кроличьи моноклональные к PDX1 (#5679), к SOX9 (#82630), к FoxA2/HNF3β (#8186), к Slug (#9585) – Cell Signalling, Нидерланды.

Козлиные поликлональные к PTF1a (AF6119) – R&D Systems, США

### **Растворы**

Буфер для нанесения ДНК на гель-электрофорез в агарозе (6x): 0,25% бромфеноловый синий, 0,25% ксиленцианол, 30% глицерин

Буфер TAEх1: 40 мМ Трис-ацетат pH 8,2, 1 мМ ЭДТА

Буфер TBEх1: 90 мМ Трис-борат pH 8,3, 1 мМ ЭДТА

Буфер TE, pH 8,0: 10 мМ Трис-HCl pH 8,0, 1 мМ ЭДТА

PBS буфер (phosphate buffered saline): 1,7 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5,2 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 мМ NaCl

Буфер для денатурирующего электрофореза по Лэммли: 25 мМ Трис, 250 мМ глицин, 0,1% SDS

Буфер для переноса при проведении Вестерн-блот анализа: 25 мМ Трис, 192 мМ глицин, 20% метанол

Лизирующий буфер для экстракции белков из клеток - Tris-Glycine SDS sample buffer (2x)

Буфер для рестрикции BamHI: 10 мМ Трис-HCl (pH 7,4 при 25°C), 200 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 0,1 мМ ЭДТА, 0,15% Triton X-100, 0,2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина и 50% (в/о) глицерин.

Буфер для рестрикции EcoRI: 50 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 100 мМ NaCl, 0,02% Triton X-100 и 0,1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина.

Буфер для рестрикции NcoI, SmaI, XbaI: 33 мМ Трис-ацетат (pH 7,9), 10 мМ  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , 66 мМ  $\text{K}(\text{CH}_3\text{COO})$  и 0,1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина.

Буфер для рестрикции SmaI, HindIII, XhoI: 10мМ Трис-HCl (pH 8), 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 100 мМ KCl, 0,1мг/мл бычьего сывороточного альбумина.

Буфер для рестрикции HindIII, MluI, XhoI: 10мМ Трис-НСl (рН 8), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ KCl, 0,1мг/мл бычьего сывороточного альбумина.

Буфер для рестрикции NotI, PstI, SalI: 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ KCl, 0,1мг/мл бычьего сывороточного альбумина.

Буфер для рестрикции PvuII: 10мМ Трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ NaCl, 0,1мг/мл бычьего сывороточного альбумина.

Буфер для рестрикции PmeI: 10мМ Трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1мг/мл бычьего сывороточного альбумина.

Буфер для лигирования: 30 мМ Трис-НСl (рН 7,8), 100 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ DTT, 1мМ АТР.

### **Среды для культивирования клеток**

Среды для культивирования клеток *E.coli*:

Среда LB: 10 г триптон, 5 г дрожжевой экстракт, 5 г NaCl на 1 литр H<sub>2</sub>O.

Среда LB с ампициллином/канамицином: к среде LB добавляли раствор ампициллина/канамицина до концентрации 100 и 25 мкг, соответственно.

Агаризованная среда LB с ампициллином/канамицином: 1,5% раствор агара в среде LB с добавлением ампициллина или канамицина до концентрации 100 и 25 мкг соответственно.

Среды для культивирования эукариотических клеток:

Среда DMEM/F12: сухая смесь DMEM/F12 (Gibco, США) 1:1, 10% эмбриональная сыворотка телёнка («Invitrogen» (США)), смесь антибиотиков (1x Antibiotic-Antimycotic, «Invitrogen» (США)).

Среда RPMI: RPMI-1640 (Gibco, США), 10% эмбриональная сыворотка телёнка («Invitrogen» (США)), смесь антибиотиков (1x Antibiotic-Antimycotic, «Invitrogen» (США)).

### **Наборы реактивов**

Набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Miniprep – Евроген, Россия

Набор для выделения ДНК из реакционных смесей Cleanup Mini – Евроген, Россия

Набор для синтеза кДНК Mint – Евроген, Россия

Набор для выделения РНК RNeasy Mini Kit – QIAGEN, США

Immun-Star HRP Peroxide Buffer, Immun-Star HRP Luminol/Enhancer – Bio-Rad, США

Набор для анализа пролиферативной активности клеток CellTiter 96 Aqueous One Solution Assay - «Promega», США

## **Маркеры**

Маркеры длин ДНК 100 п.н., 1 т.п.н. – Sybenzyme, Россия

Маркер молекулярных масс белков Precision Plus Protein Standarts Dual Color – Bio-Rad, США

## **Оборудование**

В работе использованы центрифуги Mini Spin 5415C (Eppendorf, Германия), Sigma 2K15 (Sigma, Германия), Multifuge 3 L-R (Heraeus, Германия); источники питания Эльф-4 (ДНК-технология, Россия), Power Pac (Bio-Rad, США); электронные весы Sartorius GmbH Gottingen E 5500 S (Германия); автоклав PVI Autoclave Stematic III (США); вортекс (миксер) ВП-1 (Россия); магнитная мешалка ММ 2А (Чехия); термостат Термит (ДНК-технология, Россия); аквадистиллятор электрический аптечный ДЭ-4-02-ЭМО (Россия); спектрофотометр Gene-Quant (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция); ПЦР-амплификатор PTC-100 Thermal Cycler (MJ Reseach, США); автоматические пипетки (Gilson, Франция и Labmate, Польша); многофункциональный спектрофлуориметр GENios Pro (Tecan, Швейцария); микроскоп Nikon eclipse TE 2000-U с предустановленной эпифлуоресцентной оптикой CCD (Nikon Instruments Europe, Netherlands) и охлаждаемой CCD камера (DS-5Mc, Nikon); прибор Bio-Rad VersaDoc MP4000 (Bio-Rad, США); цифровая фотокамера, УФ-излучатель White/Ultraviolet Transilluminator (Ultra Violet Products, США) и программа для обработки изображения Grabit 2,59 (UVP Inc., США); камера для горизонтального электрофореза (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция); камера для вертикального электрофореза по Лэммли (BioRad, США); прибор для переноса белков Bio-Rad Trans-Blot SD cell (Bio-Rad, США); термостатируемая качалка Certomat H (B.Braun Biotech Intrnational, Германия); ламинарные шкафы (Babcock-BSH, Германия и Gelaire, Италия); автоматический CO<sub>2</sub> инкубатор IR 1500 (Flow Laboratories, США); спектрофотометр Nanodrop2000 (Thermo Fisher Scientific, США)

## **Расходные материалы**

Пластиковые наконечники для автоматических пипеток и пробирки для ПЦР (Treff Lab, Швейцария и QSP, США); пластиковые пробирки 1,5 и 2 мл (Eppendorf, Германия); пробирки 15 мл и 50 мл (Corning, США); чашки Петри Завода Медицинских Полимеров (Россия); планшеты и флаконы для культивирования эукариотических клеток (Costar, США); мембрана PVDF Immobilon-P (Millipore, Англия); парафиновая пленка Microseal A film (MJ Research, США), анионообменная бумага DE-81 (Whatman, Великобритания).

## **Бактериальные клетки**

Для трансформации использовали компетентные клетки *E.coli* штамма DH5 $\alpha$ , приготовленные в лаборатории структуры и функции генов человека ИБХ РАН Н.И.Медведевой.

### Культуры клеток

В работе использовали опухолевые клеточные линии человека (Табл. 1):

**Табл. 1.** Характеристика использованных в работе клеточных линий и первичных культур клеток.

Название клеточной линии	Номер образца в гистологической коллекции	Гистологическая характеристика
Клеточные линии рака поджелудочной железы		
AsPC-1	ATCC Number: CRL-1682	Аденокарцинома поджелудочной железы человека
VxPC-3	ATCC Number: CRL-1687	Аденокарцинома поджелудочной железы человека
Capan-2	ATCC Number: HTB-80	Аденокарцинома поджелудочной железы человека
MiaPaCa-2	ATCC Number: CRL-1420	Аденокарцинома поджелудочной железы человека
PANC-1	ATCC Number: CRL-1469	Аденокарцинома поджелудочной железы человека
Клеточные линии иного происхождения		
HEK293	ATCC Number: CRL-1573	Трансформированные клетки почки человека

### Клинические образцы ткани

Для исследования использовали клинические образцы ткани ПАПЖ человека, полученные во время проведения гастропанкреатодуоденальных резекций пациентов с ПАКПЖ, образцы нормальной ПЖ и образцы фетальной ПЖ, любезно предоставленные ГБУЗ Городская клиническая больница №5 ДЗ г. Москвы, ФГБУ «Институт хирургии им. А.В. Вишневского» МЗ РФ, ГБУЗ «Центральный Научно-Исследовательский Институт Гастроэнтерологии, ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени

академика В.И. Кулакова» МЗ РФ. Взятые образцы замораживали в жидком азоте, после чего хранили их при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Характеристика образцов приведена в Табл. 2:

**Табл. 2.** Характеристика хирургических образцов, использованных для приготовления панели кДНК

<b>Образцы опухолей поджелудочной железы (N=39)</b>	
Пол пациентов (М/Ж)	20 / 19
Возраст (среднее $\pm$ SD, года)	57 $\pm$ 9
Степень злокачественности опухоли (высокодифференцированные/умеренодифференцированные/недифференцированные/неизвестно)	2 / 10 / 6 / 20
Стадия (2/3/4/неизвестно)	2 / 24 / 4 / 7
<b>Образцы нормальной поджелудочной железы (N=4*3)</b>	
Часть поджелудочной железы (головка/тело/хвост)	4 / 4 / 4
<b>Образцы фетальной поджелудочной железы (N=16)</b>	
Недели беременности	12-24

### **Плазмидные векторы**

В работе использовали следующие плазмидные векторы:

Лентивирусные вектора для упаковки вирусных частиц pCMV-dR8.2, pMD2.G, pCDNA3.1 puro-Nodomiga, полученные от Д. А.Дидыча (Институт биоорганической химии РАН, Москва).

Экспрессирующий плазмидный вектор pCMV6-PDX1-Myc-DDK-Tagged (NM\_000209 , Origene, США).

Экспрессирующий лентивирусный вектор pLVPGm.1 с репортерным геном Турбо-GFP, созданный из вектора pLVT-MCSmut, сконструированного на основе плазмиды pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE, любезно предоставленной профессором Д. Троне (Prof. D. Trono, Lausanne, Switzerland). Вектор pLVT-MCSmut был любезно предоставлен др. В.В. Белоусовым (Институт биоорганической химии РАН, Москва).

Лентивирусный вектор pLVP-Puro, содержащий ген устойчивости к пурамицину, полученный от Д.А. Дидыча (Институт биоорганической химии РАН, Москва).

Плазмидный вектор pGL3-phPCNAsh, сконструированный на основе pGL3 BasicVector (Promega, США), полученный от И.П. Чернова (Институт биоорганической химии РАН, Москва).

### Праймеры

Для конструирования праймеров были использованы программы Primer3 и GeneRunner. Уникальность праймеров проверяли с помощью программы BLAST. Праймеры были синтезированы в фирме Евроген, Россия. Последовательности праймеров для количественной ПЦР в реальном времени, анализа колоний при создании генно-инженерных конструкций, температуры отжига и получающие длины ПЦР-продуктов приведены в Табл. 3 и 4.

**Табл. 3.** Последовательности праймеров для количественной ПЦР в реальном времени, использованных в работе

Ген	Прай-мер	Последовательность	Т отжига, °С	Длина продукта ПЦР, п.н.
18S	For	5'- CGCGGTTCTATTTTGTGTTGGT-3'	58	521
	Rev	5'- ATGCCAGAGTCTCGTTCGTT-3'	60	
EEF1A	For	5'- GACACGTAGATTCGGGCAAG -3'	62	173
	Rev	5'- GATACCACGTTACGCTCA-3'	58	
HPRT	For	5'- GCTATAAATTCTTTGCTGACCTGCTG-3',	68	140
	Rev	5'-AATTACTTTTATGTCCCCTGTTGACTGG-3'	68	
GAPDH	For	5'-TAGCACCCCTGGCCAAGG-3'	58	540
	Rev	5'-CTTACTCCTTGGAGGCCATG-3'	56	
SOX9	For	5'-CTGAACGAGAGCGAGAAGCG-3'	64	213
	Rev	5'-GGAGGAGGAGTGTGGCGAG-3'	64	
PDX1	For	5'- GTCCTGGAGGAGCCCAAC-3'	60	272
	Rev	5'-CGGCGGTTTTGGAACCAGAT-3'	62	
PTF1a	For	5'-GAAGGTCATCATCTGCCATCG-3'	60	190
	Rev1	5'-CTGTTGAGTTTTCTGGGGTCC-3'	59	

GATA-4	For	5'- GTGTCAACTGTGGGGCTATG-3'	59	188
	Rev	5'- GGTGGTGGTGGTCTGGCAG-3'	62	
GATA6	For	5'- CATA CGGCAGCGGAGGCGG-3'	66	304
	Rev	5'- CTCGGATGGTGGTGGTGGTG-3'	66	
FOXA2	For	5'-GAGACTTTGGGGAGACGGTG-3',	60	188
	Rev	5'- GTTTGGGACGGAACGGCTGC-3'	64	
HNF1b	For	5'-ATGCTCAGTGAGGACCCTTG-3'	60	306
	Rev	5'-ATGGCTCTGTTGACTGAACTC-3'	58	
HES1	For	5'-TGGAAATGACAGTGAAGCACC-3'	59	163
	Rev	5'-ACCTCGGTATTAACGCCCTC-3'	60	
ONECU T1	For	5'-GCAGCGTATCACCACCGAGC-3'	64	169
	Rev	5'-CAGCCACTTCCACATCCTCC-3'	61	
NR5A2	For	5'-ACCCAGACCCCTATACCAGC-3'	60	184
	Rev	5'-CTTCGGTTAGCCTGCTCTTG-3'	58	
RBPJL	For	5'-GCTCTTGCTGGACCATCATC-3'	59	190
	Rev	5'-TCCCCAAACCACACCTTGAG-3'	60	
NGN3	For	5'-TAAGGGTAAGGGAGAGGGAG-3'	57	288
	Rev	5'-GTAGTGCTACCATTCTAGTATTC-3'	54	
NKX6.1	For	5'-GGAAGAGAAAACACACGAGAC-3'	57	354
	Rev	5'-CGCCGCTGCTGGACTTGTG-3'	64	
SNAI1	For	5'-CCAATCGGAAGCCTAACTAC-3'	56	124
	Rev	5'-GCGGTGGGGTTGAGGATCTC-3'	63	
SLUG	For	5'-AGAAGGTTTTGGAGCAGTTTTTG-3'	58	160
	Rev	5'-TGGTTGCTTCAAGGACACAT-3'	58	
CDH1	For	5'-AGTGCCTGCTTTTGATGATG-3'	57	338
	Rev	5'-AGCTTGAAGTCCGAAAAATC-3'	57	
KRT8	For	5'-ATGTTGTCCATGTTGCTTCG-3'	58	182

	Rev	5'-ACCCTCAACAAGTTTGCC-3'	58	
VIM	For	5'-GCAGAAGAATGGTACAAATCCA-3'	57	144
	Rev	5'-TTTAAGGGCATCCACTTCACA-3'	57	

**Табл. 4.** Последовательности праймеров, использованных для анализа колоний при создании генно-инженерных конструкций

Праймер	Последовательность	T отжига, °C
VP1.5	5'- GGACTTTCCAAAATGTCG-3'	56
XL39	5'- ATTAGGACAAGGCTGGTGGG-3'	60
T7	5'- TAATACGACTCACTATAGGG-3'	56
pLVPfor	5'-AAGAATCGCAAAACCAGCAA-3'	54
pLVPrev	5'-CCACCTTCTTCTTCTATTCC-3'	56
CMVf150	5'-CATTGACGTCAATGGGAGT -3'	56
CMV-R	5'-GTCATGTACTGGGCATAATG-3'	56
pCMV6-for	5'-CAATTTCCATTCGCCATTCAG-3'	60
pCMV6rev	5'-ATGATATAGATACAACGTATGC-3'	54
PCNA-LS	5'-TCTCCACATATGCCCGGACT-3'	60

### Интернет ресурсы

В работе использовались следующие программы и базы данных:

PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>

Primer3: <http://frodo.wi.mit.edu/>

GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>

BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

## 3.2. Методы

### Стандартные процедуры

Гель-электрофорез в агарозе, осаждение ДНК спиртом и другие стандартные процедуры проводили по протоколам[142].

### Расщепление плазмидной ДНК эндонуклеазами рестрикции

К плазмидной ДНК (1-2 мкг) добавляли по 5ед.-10 ед. эндонуклеазы рестрикции, 1х буфер и деионизованную воду до нужного объёма. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение часа. К реакционной смеси добавляли буфер для нанесения и наносили на 1% агарозный гель. Вырезали из геля полосу нужной длины и выделяли ДНК с помощью набора реактивов Cleanup Mini.

### Достройка 3'-концов ДНК фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I E. coli

Для получения «тупых» концов молекулы ДНК после ее обработки эндонуклеазами рестрикции, образующими 5' выступающие концы, использовали фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I E. coli. Состав реакционной смеси: 0,1-4 мкг линеаризованной ДНК, растворенной в деионизованной воде, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты в конечной концентрации 0,05 мМ каждый, буфер для фрагмента Кленова (1х), 1-5 ед. фрагмента Кленова. Общий объем смеси – 20 мкл. Смесь инкубировали в течение 5 минут при 37°C и инактивировали фермент при 75°C 15 минут.

### Дефосфорилирование 5'-концов молекулы ДНК

Смешивали 1 мкл (примерно 1 пмоль концов) линейной ДНК (около 3 т.п.о), буфер для SAP (x1), 1 ед. SAP. Общий объем – 20 мкл. Смесь инкубировали в течение 30 минут при 37°C и инактивировали фермент при 75°C 15 минут.

### Лигирование последовательностей ДНК в плазмиду

К 25-50 нг линеаризованного вектора добавляли 1 ед. лигазы T4, 1X буфер для лигирования, клонируемую вставку ДНК в количестве, рассчитанном по формуле, приведенной ниже, и деионизованную воду до нужного объёма. Инкубировали реакционную смесь при 4°C в течение ночи.

Количество клонируемой вставки(нг)=количество линеаризованного вектора(нг)\*размер вставки(кБ)\*(соотношение вставка:вектор 3:1)/размер вектора(кБ)

### Трансформация клеток E.coli плазмидной ДНК

Суспензию компетентных клеток *E.coli* штамма DH5 $\alpha$  размораживали во льду, добавляли к клеткам 50 нг вектора и инкубировали во льду 30 минут для адсорбции вектора на поверхности клеток. Затем проводили тепловой шок, инкубируя клеточную суспензию при 42°C 30 сек, и переносили в лёд на 5-10 минут. К трансформированным клеткам добавляли пятикратный объём LB и инкубировали при 37°C в течение 60 минут, перемешивая раз в 20 мин.

1/10 объёма суспензии высевали на чашку Петри с агаризированной LB средой с ампициллином. Чашки Петри инкубировали в термостате при 37°C в течение ночи.

#### **Анализ трансформированных колоний *E.coli* методом полимеразной цепной реакции**

Наконечником автоматической пипетки отбирали часть индивидуальной колонии с чашки Петри, суспендировали клеточный материал в 15 мкл mQ. Клетки разрушали нагреванием, инкубируя при 95°C в течение 5 минут. Клеточный лизат центрифугировали в течение 5 минут, 14000 об./мин и 5 мкл супернатанта использовали в качестве матрицы для последующей полимеразной цепной реакции.

Для дополнительного контроля прохождения реакции использовали лигазную смесь в качестве матрицы, для контроля чистоты реактивов и работы проводили контрольную реакцию, в которой присутствовали все компоненты кроме ДНК матрицы.

Реакцию проводили в ПЦР-амплификаторе с горячей крышкой, используя следующий режим:

*Предварительный нагрев:* 94°C – 90 сек.

*Денатурация:* 94° С – 30 сек.

*Отжиг праймеров:* температура индивидуальная для каждой пары праймеров, указана в Табл.

*Синтез:* 72° С : время элонгации подбирали в зависимости от размера вставки.

Количество циклов амплификации подбирали экспериментальным путем.

#### **Определение нуклеотидной последовательности ДНК**

Определение нуклеотидной последовательностей ДНК проводили в компании Евроген. Анализ хроматограмм проводили при помощи программ FinchTV 1.4.0 и Vector NTI.

#### **Получение аналитических и препаративных количеств ДНК плазмиды**

Суспензию клеток в LB с ампициллином (100 мкг /1 мл LB) или канамицином (25 мкг/1 мл LB) переносили в пробирку с LB и ампициллином (100 мкг/1 мл LB) или канамицином (25

мкг/1 мл LB). Объем LB варьировал в зависимости от необходимого количества плазмиды. Пробирку помещали на микробиологическую качалку (180 об./мин) на 12 часов при 37°C.

Плазмиду выделяли при помощи коммерческого набора для выделения плазмидной ДНК Plasmid Miniprep компании Евроген, согласно стандартным протоколам, в зависимости от объема LB.

### **Определение концентрации нуклеиновых кислот**

Растворы нуклеиновых кислот использовали для определения количества плазмиды спектрофотометрическим методом при помощи прибора Nanodrop2000 компании Thermo Fisher Scientific. Измеряли поглощение при длине волны 260 нм.

### **Получение генно-инженерных конструкций**

Для создания экспрессионной лентивирусной конструкции, несущей ген PDX1 под управлением PCNA промотора, были получены конструкции на основе лентивирусного вектора pLVP. Для этого вектор pLVP обрабатывали эндонуклеазой рестрикции AfeI, затем выступающие 5'-концы достраивали при помощи фрагмента Кленова, после чего расщепляли линейаризованную ДНК расщепляли при помощи эндонуклеазы SanDI, и дефосфориливали при помощи SAP-фосфатазы. Экспрессионную кассету PCNA-PDX1 «вырезали» из промежуточной конструкции следующим образом: расщепляли плазмиду эндонуклеазой SpeI затем выступающие 5'-концы достраивали при помощи фрагмента Кленова, после чего расщепляли линейаризованную ДНК расщепляли при помощи эндонуклеазы SanDI. После подготовки вектора и вставки проводили «полутупое» лигирование.

### **Трансфекция эукариотических клеток липофектамино 2000**

Липофекцию проводили согласно стандартному протоколу производителя липофектамина 2000 («Invitrogen»). Расчёт приведен для культурального флакона с поверхностью роста клеток 25 см<sup>2</sup>. На первом этапе готовили 2 смеси: 8 мкг плазмидной ДНК смешивали с 500 мкл клеточной среды Opti-MEM и 20 мкл липофектамина 2000 смешивали с 500 мкл среды Opti-MEM. Полученные смеси инкубировали 5 минут, после чего смешивали друг с другом, добавляя 4 мл Opti-MEM и инкубировали ещё 20 минут. Затем клеточную среду DMEM:F12 трансфицируемых клеток заменяли на 5 мл полученной смеси липофектамина 2000, плазмидной ДНК и Opti-MEM инкубировали в CO<sub>2</sub> инкубаторе 4 часа. После этого убирали трансфекционную смесь и добавляли 5 мл среды DMEM:F12 без антибиотиков. Через 24 часа среду DMEM:F12 без антибиотиков заменяли на среду с антибиотиками: 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 0,25 мкг/мл амфотерицина.

### **Упаковка вирусных частиц, получение стабильных трансфектантов**

За день до трансфекции клетки HEK293T рассеивали в количестве  $5 \times 10^5$  клеток на 6-луночные культуральные флаконы. На следующий день проводили трансфекцию Липофектамином 2000 клеток смесью из четырех плазмид, три из которых кодировали структурные и функциональные белки лентивируса (частиц pCMV-dR8.2, pMD2.G, pCDNA3.1 puго-Nodomura). Четвертая плазида несла кодирующую часть гена PDX1 под контролем PCNA промотора (вектор pLVP-PCNA-PDX1), или ген EGFP (вектор pLVPGm.1) или использовалась для получения контрольных культур (pLVP-puго). Через 48 часов собирали кондиционированную среду, содержащую лентивирусные частицы, фильтровали ее через фильтр с размером пор 0,45 мкм и замораживали вирусные стоки в криовиалах на 2 мл при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Для проведения вирусной трансдукции клетки линий рака поджелудочной железы рассеивали в культуральные флаконы с поверхностью роста клеток  $25 \text{ см}^2$ . На следующий день 1 мл вирусного стока смешивали с 4 мл культуральной среды и добавляли к клеткам. Через 48 часов в культуральную среду добавляли антибиотик пурамицин (до концентрации 2,5-4 мкг/мл в зависимости от линии), после чего проводили селекцию в течение 10-14 дней в зависимости от линии. В ходе селекции клетки линий рака поджелудочной железы, не подвергшиеся инфекции, погибали; после проведения селекции полученные клеточные культуры оценивали по уровню экспрессии PDX1 и EGFP.

#### **MTS-тест**

MTS-тест проводили при помощи CellTiter 96 Aqueous One Solution Assay («Promega», США), согласно стандартному протоколу. Количество живых клеток определяли по поглощению при длине волны 490 нм с помощью спектрофлуориметра GENios Pro.

#### **Миграционный тест**

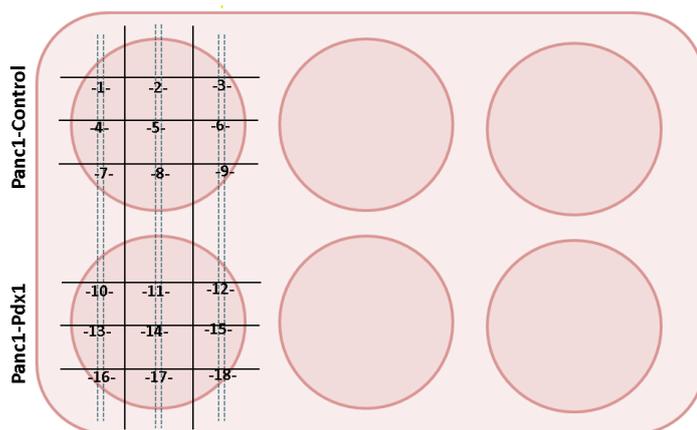
Клетки обрабатывали трипсином и суспендировали в среде, не содержащей сыворотку, после чего подсчитывали количество клеток в 1 мл суспензии. В верхнее отделение модифицированной камеры Бойдена для 6-луночных планшетов «Corning Transwell Insert» (Corning, США) с размером пор 8,0 мкм вносили по 50000 клеток в 300 мкл среды, не содержащей сыворотку. В нижнее отделение камеры вносили 500 мкл среды с 5%-й сывороткой в качестве хемоаттрактанта. Инкубировали планшет с камерами при  $+37^{\circ}\text{C}$  в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$  16 часов.

Для подсчета количества мигрировавших сквозь мембрану камеры клеток извлекали камеру из планшета и промывали PBS. Удаляли клетки из верхнего отделения камеры при

помощи ватной палочки, смоченной в среде с сывороткой. При помощи флуоресцентного имэджера ZOE подсчитывали количество клеток на нижней поверхности мембраны.

### Scratch assay (модель раны монослоя)

Для оценки скорости миграции клеток линий рака поджелудочной железы использовали модель миграции клеток в рану монослоя. Клетки линии PANC-1, экспрессирующие PDX1, и контрольные клетки линии PANC-1 пассажа высаживали в 6-ти луночный планшет в концентрации  $1 \cdot 10^5$ . На следующий день каждой лунке прочерчивали «царапину» стерильным синим наконечником. После нанесения царапины на монослой клеток, области раны фотографировали с помощью флуоресцентного имэджера ZOE. Спустя 24 часа наблюдали, как клетки мигрируют в область повреждения и заполняют пустую поверхность, и делали повторные снимки областей повреждения в тех же местах, для которых были получены микрофотографии сразу после нанесения царапины. Схема эксперимента и «разметка» монослоя клеток представлены на Рис. 6. Проводили 3-5 независимых биологических повторов эксперимента.



**Рис. 6.** Схема расположения царапин на монослое. Цифрами обозначены анализируемые области сразу после нанесения раны и спустя 24 часа.

С помощью программы ImageJ анализировали количество занятого клетками PANC1<sup>Control</sup> и PANC1<sup>PDX1</sup> места в областях царапины в момент нанесения и спустя 24 часа. Результаты усредняли и статистически обрабатывали с использованием программы Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, США). Полученные значения средних скоростей сравнивали с помощью параметрического t-критерия Стьюдента с оценкой нормальности распределения значений. Статистическая достоверность была установлена при  $p < 0.05$ .

### Проточная цитометрия

Образцы анализировали методом проточной цитометрии на приборе BD FACScan (BD Biosciences, США). Анализ полученных данных проводили с использованием программы FlowJo (FlowJo, США). В каждом случае анализировали не менее  $10^4$  событий.

Для анализа гомогенности клеточной популяции использовали данные по прямому (FSC) и угловому (SSC) светорассеянию путем построения двумерных гистограмм распределения клеток по размеру и степени зернистости. На данной стадии для дальнейшего анализа выделяли основную популяцию клеток (75-90 % во всех случаях), исключая клеточные агрегаты и дебрис. Для дополнительного исключения агрегатов клеток и посторонних частиц проводили анализ интенсивности флуоресценции йодида пропидия в канале FL2 или FL3 в зависимости от конкретного эксперимента

### **Анализ клеточного цикла**

Исследование клеточного цикла проводили с помощью проточной цитофлуориметрии. После инкубации с препаратами клетки собирали, промывали PBS, фиксировали 70% этанолом в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл при  $4^\circ\text{C}$  в течение 1–2 часов и хранили до исследования при  $-20^\circ\text{C}$ . Фиксированные клетки осаждали центрифугированием при 400 g, дважды промывали PBS перед использованием, ресуспендировали в растворе для окрашивания ДНК (2xPBS, 0,05 мг/мл рибонуклеазы А, 50 мкг/мл йодистого пропидия) в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл и инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте. Исходный раствор рибонуклеазы А предварительно кипятили на водяной бане в течение 10 мин, чтобы избавиться от возможной примеси дезоксирибонуклеаз. Анализ проводили с помощью проточного цитофлуориметра BD FACScan (BD Biosciences, США), при длине волны возбуждения 488 нм и полосе пропускания 620 нм. Анализ полученных данных проводили с использованием программы FlowJo (FlowJo, США).

### **Приготовление осадков эукариотических клеток**

Клеточную среду сливали из культурального флакона с поверхностью роста клеток  $25 \text{ см}^2$  и промывали клетки 5 мл PBS буфера. После этого добавляли к клеткам 1 мл раствора 0,05% трипсина с 1 мМ ЭДТА и инкубировали в  $\text{CO}_2$  инкубаторе 2-5 минут до открепления клеток от поверхности матрасика. Затем добавляли к клеткам 5-9 мл (в зависимости от количества клеток) среды DMEM:F12 и суспендировали клетки до гомогенности. Определяли количество клеток в полученной суспензии. Полученную суспензию помещали в пробирку на 15 мл и центрифугировали 5 минут при  $7^\circ\text{C}$  и 160g (1000 об/мин). После центрифугирования сливали супернатант, добавляли 10 мл PBS буфера, суспендировали клетки и снова центрифугировали. После этого сливали супернатант, суспендировали клетки в 1мл PBS буфера и переносили в пробирку на 1,5 мл. Затем центрифугировали клетки 2 минуты при  $7^\circ\text{C}$  и 3000 об/мин и убрали

супернатант. Полученные клеточные осадки хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  до получения клеточного лизата.

### **Приготовление лизатов эукариотических клеток**

Для получения клеточного лизата клетки суспендировали в буфере для нанесения образцов при электрофорезе по Лэммли, с добавлением 2% меркаптоэтанола, лизат прогревали при  $92^{\circ}\text{C}$  в течение 5 минут, после чего центрифугировали при 14000 об/мин, 5 минут.

### **Иммуноблоттинг (вестерн блот гибридизация)**

*Денатурирующий электрофорез белков в ПААГ по Лэммли.* Электрофорез белков по Лэммли проводили в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия в трис-глициновой буферной системе. При электрофорезе использовали 4% концентрирующий и 12% разделяющий гели. Электрофорез проводили при напряжении 80 В и силе тока 200 мА (на стадии концентрирования) и напряжении 100 В и силе тока 10-30 мА (на стадии разделения) в течение 2 часов.

*Полусухой перенос белков "Semi-dry".* После электрофореза полиакриламидный гель выдерживали в буфере для переноса в течение 15 минут, измеряли его окончательные длину и ширину и вырезали по размеру мембрану "Immobilone-P" (Millipore) и листы Whatman 3MM. Мембрану инкубировали в метаноле 1 минуту, отмывали водой в течение 3-х минут и помещали в буфер для переноса. Далее проводили блоттинг при напряжении 15 В и силе тока 1 А в течение 1 часа по стандартному протоколу (Hoefler. Protein electrophoresis. Applications guide)

*Иммунодетекция антигенов.* Поверхность мембраны блокировали 5% раствором молока (non fat dry milk) в буфере PBS, содержащем 5% Tween-20 в течение 1 часа. Антитела в отношении 1 : 5000 – 1 : 10000 смешивали с 5% раствором молока (non fat dry milk) в буфере PBS, содержащем 5% Tween-20. С приготовленным раствором антител инкубировали мембрану в течение ночи. После этого мембрану отмывали тем же буфером 4 раза по 10 минут и инкубировали с раствором конъюгата ослиных антител (к мышинным/овечьим IgG) с пероксидазой хрена в разведении 1: 1000 в течение часа и снова отмывали. Белки визуализировали с помощью набора Immun-Star HRP Chemiluminescent и регистрировали на приборе Bio-Rad VersaDoc MP4000, используя компьютерную программу Quantity One.

### **Выделение суммарной клеточной РНК**

Из полученных клеточных осадков получали образцы тотальной РНК при помощи набора для выделения РНК «RNeasy Plus Mini Kit» (QIAGEN, Германия).

Далее РНК выделяли в соответствии с протоколом, предлагаемым производителем. РНК элюировали с колонки в 30 мкл воды, свободной от рибонуклеаз. Полученные препараты хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Качество полученных препаратов РНК проверяли визуально при помощи электрофореза. Электрофорез РНК проводили на горизонтальных пластинах 1,0% агарозного геля, приготовленного на буфере ТАЕ (10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ ЭДТА (Sigma-Aldrich, США)) с добавлением бромистого этидия. В электрофорез брали 1 мкл раствора РНК и 1 мкл краски (1 мМ ЭДТА, 0,25% бромфеноловый синий, 0,25% ксилен-цианол, 50% глицерин (Sigma-Aldrich, США) в  $\text{H}_2\text{O}$ ). Электрофорез РНК проводили в течение 30 минут в поле с напряженностью 2-5 В/см. Концентрацию РНК определяли по оптической плотности раствора, измеренной на спектрофотометре NanoDrop-1000 (Thermo Scientific, США) при длине волны 260 нм. Об отсутствии примесей в образце судили по соотношению значений оптической плотности раствора при длинах волн 230, 260 и 280 нм.

### **Обратная транскрипция**

Для проведения обратной транскрипции 11 мкл смеси, содержащей 5 мкг РНК и 0,2 мкг случайных гексамерных олигонуклеотидов, денатурировали при  $70^{\circ}\text{C}$  3 мин и охлаждали на льду. Затем добавляли 9 мкл ОТ-смеси следующего состава: 4 мкл 5x First Strand буфера, 2 мкл смеси дезоксинуклеозид-трифосфатов по 2,5 мМ каждого, 2 мкл 2 мМ дитиотритолола, 50 ед. обратной транскриптазы Mint (реактивы из набора для синтеза кДНК Mint (Евроген, Россия). Реакцию проводили в следующем режиме: 10 мин при  $20^{\circ}\text{C}$ , 15 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ , 60 мин при  $42^{\circ}\text{C}$ , 10 мин при  $65^{\circ}\text{C}$ , затем объем смеси доводили  $\text{H}_2\text{O}$  до 100 мкл и использовали аликвоты для проведения полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами.

### **Количественная полимеразная цепная реакция с детекцией в реальном времени**

Для проведения ПЦР использовали набор реактивов для проведения qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Использовали пары праймеров, представленные в Табл. 3.

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала: смесь после ОТ из расчета 10 нг исходной РНК на одну пробу, 5 мкл 5x qPCRmix-HS SYBR, 5 пкмоль каждого праймера, деионизированную воду.

ПЦР проводили в амплификаторе «LightCycler480» (Roche Life Science, США). Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ LightCycler® 480Software (IdahoTechnology, Inc.), LinRegPCR, Excel 2010 (Microsoft, США), StatSoft Statistica 6.0.

В работе были использованы следующие температурные параметры:

- 1) 95° C – 5 мин. – первичная полная денатурация.
- 2) 45 циклов амплификация: 95° C – 20 сек – денатурация;  
T(отжиг) – 20 сек – отжиг праймеров (см. Таблицу);  
72° C – 20 сек – элонгация;
- 3) 55-95° C – повышение температуры на 1° C каждые 10 сек – построение кривой плавления ДНК в ПЦР-смеси;
- 5) 4° C – хранение.

Температура отжига праймеров была подобрана для достижения наибольшей эффективности ПЦР (Табл.3). Пороговые значения для количественного анализа подбирали так, чтобы реакция находилась в логарифмической фазе. Специфичность реакции проверяли, анализируя кривую плавления продуктов в ПЦР-смеси после реакции.

### **Статистический анализ**

Статистический анализ проводили при помощи программы GraphPad PRISM 5.0 («GraphPad Software Inc», США) и StatSoft Statistica 6.0, величина  $p < 0,05$  считалась статистически значимой. Данные приведены с учётом стандартного отклонения, определённого минимум в трёх независимых экспериментах.

### **Эксперименты *in vivo***

Эксперименты *in vivo* проводили в лаборатории белковой инженерии Института молекулярной генетики РАН.

### **Этическое соглашение**

Эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с этическими принципами и предписаниями, рекомендованными Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных (СДСЕ № 123) и с нормами биоэтики (<https://cioms.ch/images/stories/CIOMS/IGP2012.pdf>).

### **Зебрафиш**

Рыбы содержались в проточной аквариумной системе (Aqua Schwarz GmbH, Германия) при температуре 28°С. Световой режим в соответствии с международным стандартом поддерживался в соотношении 14 ч/10 ч свет/темнота. Кормление производили 1 раз в сутки науплиями *Artemia salina* (Барром, Россия) и сухим кормом Sera Vipran (Sera GmbH, Германия). В работе использовали линию *Danio rerio* дикого типа АВ.

### **Подготовка раковых клеток для ксенотрансплантации**

Для подготовки клеточного образца клетки обрабатывали 0,25 % трипсина в растворе Хенка (ПанЭко, Россия), промывали раствором ФСБ (ПанЭко, Россия), получали клеточную суспензию с концентрацией  $10^6$  клеток на 100 мкл раствора ФСБ.

### **Ксенотрансплантация раковых клеток в эмбрионы *Danio rerio***

Для ксенотрансплантации использовали эмбрионы в возрасте 48 ч.п.ф.(часов после фертилизации), которые были предварительно дехорионизированы и анестезированы водным раствором 0,006 % трикаина (Sigma-Aldrich, США).

Эмбрионы укладывали на агаризованную подложку и проводили процедуру инъекции в желточный мешок, при этом использовали пневматический микроинъектор PicoPump PV820 (World Precision Instruments Inc., США), с выставленными параметрами давления - 20 psi и временем подачи образца - 100 миллисекунд, микроманипулятор M-152 (Narashige, Япония) и микроскоп Olympus СКХ41 (Olympus, Япония). Также использовали стеклянные капилляры (cat.# BF100-50-10 Sutter instrument, США) с внешним диаметром 40 мкм, полученные на приборе для вытягивания капилляров для микроинъекций Model P-97 (Sutter Instrument, Co, США).

Эмбрионов после инъекции содержали в воде при +28°C в течение первых двух часов, затем повышали температуру содержания до +34°C.

Через 5 ч после инъекции проводили биоимиджинг инъецированных эмбрионов, оставляя для дальнейшего анализа тех особей, у которых обнаруживали 100-200 клеток в месте инъекции, и не наблюдали клеток в кровеносных сосудах.

### **Биоимиджинг**

Биоимиджинг эмбрионов после ксенотрансплантации проводили с использованием прямого флуоресцентного микроскопа Leica ICC50 HD (Leica Microsystems CMS GmbH, Германия) с фильтром для GFP репортера. Оценку миграции опухолевых клеток в теле эмбриона выполняли на оцифрованных изображениях инъецированных эмбрионов.

Биоимиджинг анализируемых эмбрионов проводили раз в сутки после трансплантации.

## 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На основании данных, изложенных в обзоре литературы, мы сделали предположение, что гены мастер регуляторов поджелудочной железы могут быть вовлечены в процессы прогрессии рака поджелудочной железы. Чтобы проверить эту гипотезу, мы исследовали экспрессию выбранных генов мастер регуляторов в опухолевых и нормальных образцах поджелудочной железы, а также на модельных линиях РПЖ. Вовлеченность мастер генов в канцерогенез также изучали, моделируя эпителиально-мезенхимальный переход раковых клеток и изменяя уровень синтеза мастер регулятора *PDX1*, координирующего эмбриональное развитие поджелудочной железы.

### 4.1. Относительный уровень экспрессии мастер генов в опухолевых, нормальных и фетальных образцах ПЖ

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

Всего было исследовано 67 образцов кДНК, полученных из тканей ПЖ, из них 39 образцов рака ПЖ (РПЖ) II—IV стадии; 12 образцов неизменной ткани ПЖ в качестве контрольной группы; 16 образцов фетальной поджелудочной железы, полученных из абортивного материала, соответствующего 12-24 неделям развития (Табл. 2).

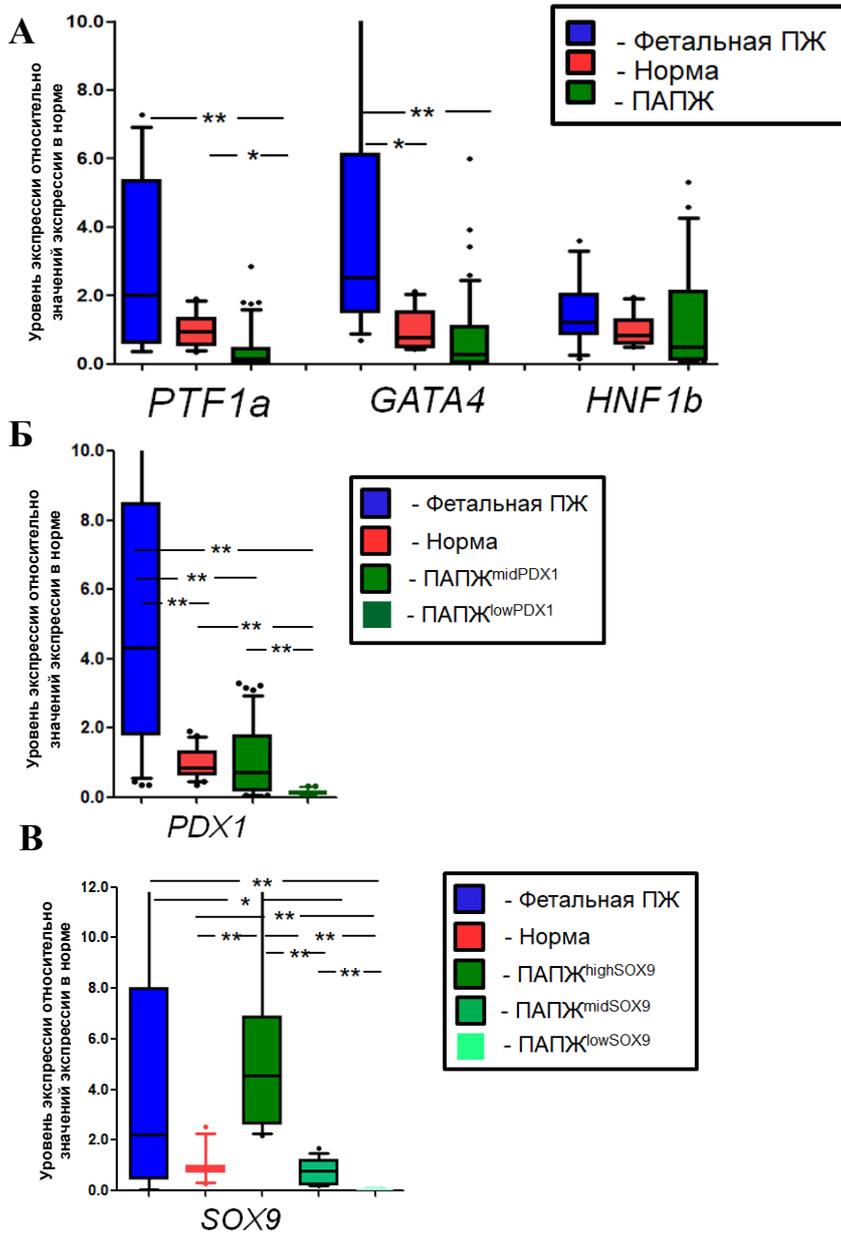
В группу больных РПЖ вошли больные в возрасте от 38 до 74 лет, средний возраст составил  $57 \pm 9$  лет. По гистологическому строению в 80% случаев опухоль представляла собой протоковую аденокарциному ПЖ 3 и 4 стадии. Регионарные метастазы отсутствовали в 31% случаев, а отдаленные – в 85%.

Уровень экспрессии генов в образцах определяли в относительных единицах по сравнению с уровнем экспрессии референсных генов, которыми в исследовании являлись *EEF1a* и *18SРНК*. Статистическую обработку результатов исследования проводили в программе StatSoft Statistica 6.0 с использованием методов непараметрического анализа.

Как и следовало ожидать из известных данных по эмбриогенезу ПЖ в образцах фетальной ПЖ относительные уровни экспрессии всех выбранных генов, кроме *HNF1b*, значительно превышали уровни экспрессии в норме: для гена *PTF1a* было обнаружено повышенное содержание мРНК в 3 раза, для гена *PDX1* – в 23 раза, для *GATA4* – в 6.5 раза, для *SOX9* в 8 раз (Рис.7). Для гена *HNF1b* подобной разницы зафиксировано не было.

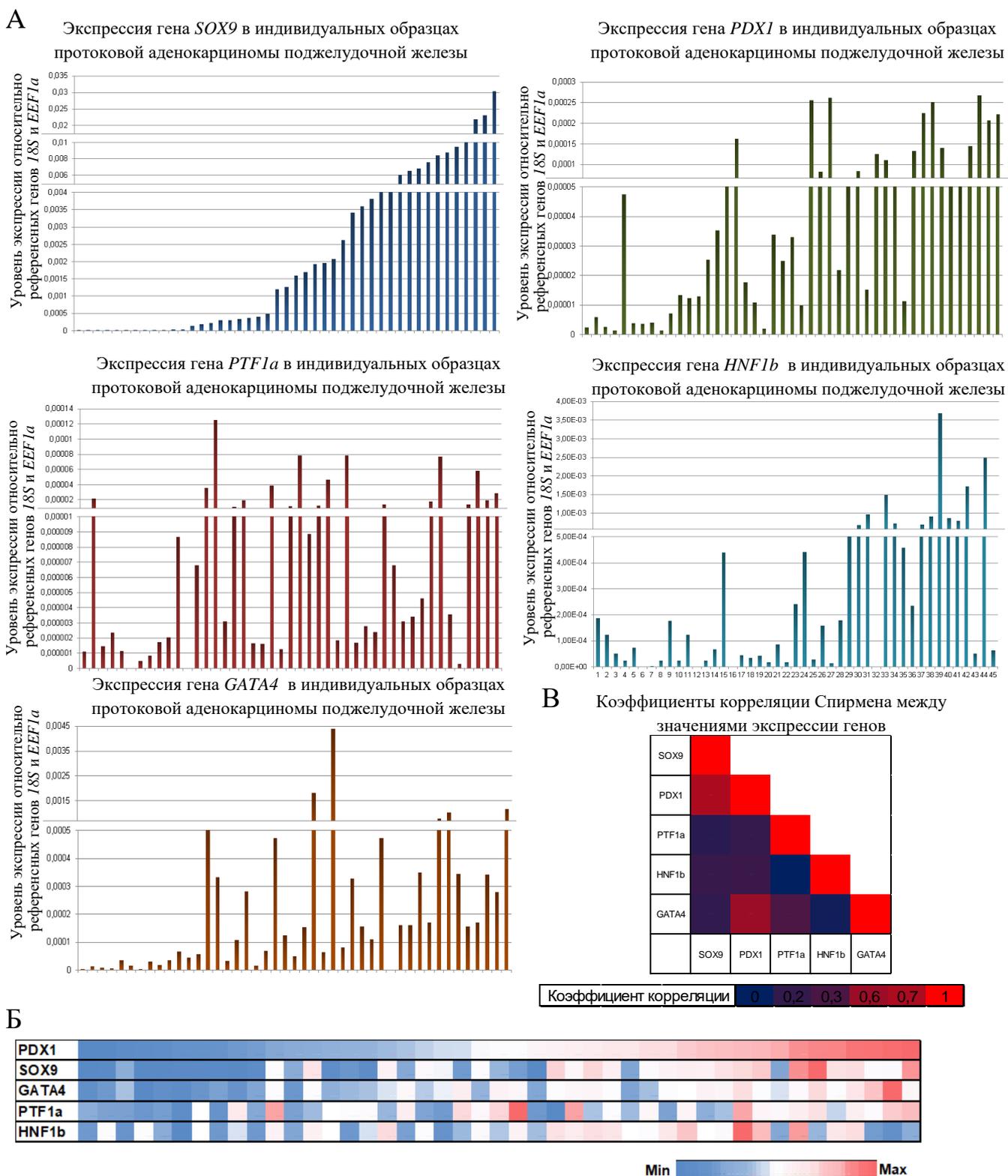
Высокий относительный уровень экспрессии мастер генов *PDX1*, *PTF1a*, *SOX9*, *GATA4* в образцах фетальной поджелудочной железы может объясняться тем, что эти гены начинают экспрессироваться на ранних стадиях эмбриогенеза и разные комбинации этих факторов определяют дифференцировку клеток при развитии ПЖ [76]. Показано, что одновременная экспрессия генов *PDX1* и *SOX9* в клетках энтодермы передней кишки приводит к обособлению мультипотентных панкреатических клеток от других клеток-предшественников, определяющих далее развитие желудочно-кишечного тракта и печени [46]. Исследования коммитирования таких клеток у мышей показали, что клетки предшественники, экспрессирующие факторы транскрипции *Pdx1* и *Ptf1a*, направляются, соответственно, по ацинарному и эндокринному направлениям дифференцировки [143], [144] и к стадии 13,5 эмбрионального дня (E13,5), эти гены становятся маркерами зрелых типов бета-эндокринных клеток и клеток ацинусов [105]. *Sox9*-позитивная популяция панкреатических клеток локализуется в центральной части эпителия, предположительно содержащего некоммитированные клетки-предшественники [145]. Дальнейшая дифференцировка таких мультипотентных *Sox9*-позитивных клеток зависит от уровня его экспрессии: при низкой экспрессии *Sox9* в этих клетках дифференцировка может пойти по ацинарному пути, при высокой экспрессии *Sox9* - по эндокринному или протоковому пути [76],[146]. Совместная экспрессия генов *PTF1a*, *GATA4*, *NR5A2*, *MIST1* и *RBPJL* в мультипотентных панкреатических клетках приводит к дифференцировке клеток в ацинарные, комбинация факторов *SOX9*, *HNf1b*, *HNf6*, *FOXA2* вызывает образование протоковых клеток, а взаимодействия транскрипционных факторов *PDX1*, *NGN3*, *NeuroD1*, *ISL1* и *FOXA2* – к дифференцировке клеток-предшественников в эндокринные клетки [46] [94]. На поздних стадия развития (>E18.5) экспрессия *Sox9* отсутствует в зрелых эндокринных клетках и детектируется только в клетках протоков[146].

При определении уровней экспрессии в опухолевых образцах мы показали (Рис. 7), что Предполагаемое на основании нашей гипотезы повышение уровня экспрессии мастер генов по сравнению с нормой наблюдается только в случае гена *SOX9* у трети образцов. В образцах опухолей ПЖ уровень экспрессии гена *PTF1a* был снижен относительно значения в норме в 2.5 раза. По уровню экспрессии гена *PDX1* образцы РПЖ были разделены на две группы: первая – ПАПЖ<sup>midPDX1</sup> – с уровнем, сравнимым с уровнем нормы, и вторая – ПАПЖ<sup>lowPDX1</sup> – с 10-кратно пониженным уровнем экспрессии *PDX1* относительно экспрессии в норме. Еще более выраженная гетерогенность экспрессии в опухолевых образцах была обнаружена для гена *SOX9*: в трети образцов относительный уровень мРНК *SOX9* был сравним с эмбриональным уровнем и превышал нормальный в 6.5 раз, в трети – соответствовал уровню нормы, и в оставшейся трети был снижен в 28 раз.



**Рис. 7. А.** Относительный уровень экспрессии мастер генов *PTF1a*, *GATA4*, *HNF1b* в образцах фетальной, нормальной и опухолевой поджелудочной железы. **Б.** Относительный уровень экспрессии мастер генов *PDX1* в образцах фетальной, нормальной и опухолевой поджелудочной железы. По уровню экспрессии гена *PDX1* образцы РПЖ были разделены на две группы: первая – ПАПЖ<sup>midPDX1</sup> – с уровнем, сравнимым с уровнем нормы, и вторая – ПАПЖ<sup>lowPDX1</sup> – с пониженным уровнем экспрессии *PDX1* относительно экспрессии в норме. **В.** По уровню экспрессии гена *SOX9* образцы РПЖ были разделены на три группы: ПАПЖ<sup>highSOX9</sup> – образцы с высоким относительным уровнем экспрессии *SOX9*, ПАПЖ<sup>midSOX9</sup> – образцы с уровнем экспрессии *SOX9*, соответствующему уровню нормы, и ПАПЖ<sup>lowSOX9</sup> – образцы с пониженным уровнем экспрессии *SOX9* относительно экспрессии в норме. Данные представлены в виде диаграммы размаха («ящик с усами», box plot), где линия обозначает медианный уровень экспрессии гена, границами «ящика» служат первый и третий квартили значений выборки, концы усов соответствуют 9 и 91 процентилям. \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ .

Уровни экспрессии всех выбранных для экспериментов генов в образцах РПЖ варьировали в широком диапазоне значений (Рис. 8.А), при этом корреляцию между низкими и высокими уровнями экспрессии и степенью дифференцированности раковых клеток в образцах выявить не удалось. Согласно данным [12], исследованные мастер-гены входят в один регуляторный модуль, участвующий в эмбриогенезе ПЖ мыши. Экспрессия этих генов тесно взаимосвязана, и, возможно, дисрегуляция одного из генов приводит к изменению уровней экспрессии остальных. Ранее показано участие этих генов и в регуляции развития протоковой аденокарциномы ПЖ [94]. Одновременное подавление или увеличение экспрессии нескольких мастер факторов в опухолевых образцах 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, в котором высшую позицию занимает один ген, потеря или снижение активности которого необходимы для опухолевой трансформации. Для проверки этой гипотезы была оценена статистическая взаимосвязь полученных значений экспрессии генов *SOX9*, *PDX1*, *PTF1a*, *HNFI1b*, и *GATA4*. Были построены тепловые карты для значений экспрессии каждого исследованного мастер гена в образцах опухолей ПЖ (Рис. 8.Б), а также рассчитаны коэффициенты корреляции Спирмена для каждой пары генов (Рис. 8.В). Было показано, 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 ( $p < 10^{-5}$ ). Корреляцию между уровнями экспрессии *SOX9* и *PDX1* а также между *GATA4* и *PDX1* и степенью дифференцированности раковых клеток выявить не удалось.



**Рис. 8.** А. Экспрессия генов мастер регуляторов эмбрионального развития в индивидуальных образцах протоковой аденокарциномы поджелудочной железы. Образцы для всех диаграмм расположены в порядке увеличения экспрессии гена *SOX9*. Значения нормированы на среднее геометрическое значений экспрессии референсных генов *18S* и *EEF1a*. Б. Общее сравнение профилей экспрессии генов *SOX9*, *PDX1*, *PTF1a*, *HNF1b*, *GATA4* в образцах опухолей ПЖ. Образцы для всех диаграмм расположены в порядке увеличения экспрессии гена *PDX1*. В. Коэффициенты корреляции Спирмена показаны между каждой парой генов.

Полученные результаты свидетельствуют о пониженной экспрессии мастера гена эмбрионального развития *PTF1a* в опухолевых образцах, что подтверждает большинство литературных данных. Ранее было показано снижение экспрессии *PTF1a* для предраковых состояний, а также ее подавление при активации *KRAS* и метаплазии ацинарных клеток [147]. Экспрессия гена *PDX1* в опухолевых тканях ПЖ очень вариабельна: на ранних стадиях опухолевой прогрессии обнаруживается повышенная экспрессия гена *PDX1*, на поздних стадиях протоковой аденокарциномы ПЖ, экспрессия практически отсутствует [88]. Оверэкспрессия *PDX1* характерна для инсулином и нейроэндокринных опухолей [148]. Большая часть использованных в нашей работе образцов соответствовала поздним стадиям развития опухоли, потому низкая экспрессия *PDX1* в таких образцах согласуется с литературными данными [88]. Гетерогенность в экспрессии *PDX1* может быть связана с изменением его функций по мере опухолевой прогрессии. Для гена *Pdx1* мыши известно, что в процессе канцерогенеза ПЖ он меняет свою функцию сначала от опухолевого супрессора к онкогену, а затем снова его роль возвращается к супрессорной [16], [94] (подробнее в обзоре литературы). Таким образом, результаты, полученные нами при определении уровней экспрессии генов *PDX1*, *PTF1a* в опухолевых, нормальных и фетальных образцах ПЖ не противоречат ранее полученным данным.

Исключением служат результаты, демонстрирующие сравнимые с уровнем экспрессии в норме уровни экспрессии генов *GATA4* и *HNF1b* в опухолевых образцах. Ранее опубликованные данные, полученные по результатам гистохимического анализа, свидетельствуют об увеличении экспрессии *GATA4* в образцах протоковой аденокарциномы ПЖ [117]. Для гена *HNF1b* в исследовании [149] было выявлено подавление его экспрессии в образцах протоковой аденокарциномы ПЖ, в экспериментах с использованием клеточных линий рака ПЖ было показано, что такое снижение связано с гиперметилованием промоторной области гена.

Похожие на полученные нами различия в уровнях экспрессии *SOX9* в опухолевых образцах были описаны в литературе. Так, в исследовании [150] приведены результаты иммуногистохимического анализа хирургических образцов пациентов с ПАПЖ и внутрипротоковыми папиллярно-муцинозными неоплазиями. Данные свидетельствуют о значительном понижении уровня белка *SOX9* в процессе трансформации нормальной ткани ПЖ к предраковым состояниям неоплазии и ПАПЖ. При этом в работах [151], [152] ген *SOX9* определен как сверхэкспрессирующийся в классических случаях ПАПЖ, показана корреляция экспрессии *SOX9* с генами сигнальных путей *Act* и *ERBB*, активно вовлеченных в процесс злокачественной трансформации. Был отмечен повышенный уровень белка *SOX9* в образцах

ПАПЖ и сниженный при предраковых состояниях по сравнению с протоками ПЖ в норме [146]. Двойственная роль SOX9 показана и на других видах рака: сверхэкспрессия SOX9 при раке кожи, предстательной железы, легких, груди и мозга способствует росту опухоли и инвазии [153], [154], однако в некоторых клетках меланомы и карциномы эндометрия SOX9 является опухолевым супрессором [155]. Гены семейства SOX в процессе опухолевой прогрессии действуют как активаторы транскрипции опухоль стимулирующих генов и репрессоры антионкогенов [156]. Показано, что позитивно регулируемой мишенью факторов SOX при развитии гепатоцеллюлярной карциномы может выступать Wnt-сигнальный путь [157], а при карциноме носоглотки негативно регулируемой мишенью является белок внеклеточного матрикса SPARC [153].

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 никакой рекапитуляции в случае ПАПЖ не происходит. Скорее всего, это связано с чрезвычайной гетерогенностью опухолевых клеток и обильным стромальным компонентом, который активно взаимодействует с раковыми клетками и влияет на свойства опухоли. Кроме того, рекапитуляция наблюдалась в опухолях, имеющих происхождение от одной общей стволовой клетки и затем пролиферировавших, давая множество гетерогенных клонов, происходящих от этого общего предшественника [28]. При ПАПЖ опухоли у разных пациентов, будучи фенотипически одинаковыми, могут происходить от разных предшественников, это явление, которое только в последние годы привлекло внимание исследователей. Классификация опухолей ПАПЖ на основе профилей транскриптомов ставит вопрос происхождения различных подтипов опухолей из разных клеток поджелудочной железы. Поджелудочная интраэпителиальная неоплазия (PanIN), интрадуктальное папиллярное муциновое новообразование (IPMN) и муцинозное кистозное новообразование (MCN), как сейчас полагают, могут являться предшественниками для образования ПАПЖ и, по-видимому, развиваются из клеток различного происхождения [158], [159]. Таким образом, ПАПЖ может представлять многочисленные болезни, разные для разных пациентов, но имеющие одинаковый фенотип [160]. В дополнение к описанию генетической гетерогенности результаты нескольких исследований свидетельствуют о многофокальной неоплазии в поджелудочной железе [161], [162].

Регуляторные мастер гены ранее рассматривались в качестве мишеней для персонализированной генной терапии рака [163]. Вместо генов, чье «включение» или «выключение», предположительно, запускало бы ту или иную форму рака у каждого человека,

авторы предположили [164], что наиболее «правильными» мишенями для терапии рака будут гены, занимающие высшие регуляторные позиции в транскрипционных сетях [163].

Предполагалось, что высокая степень защиты их экспрессии механизмами гомеостаза делает мастер гены менее чувствительным к колебаниям окружающей среды и, следовательно, менее вариабельными среди разных опухолевых образцов [163]. Такой подход к выбору генов-мишеней был использован для образцов рака почки, щитовидной железы и предстательной железы человека, а также на клеточных линиях рака щитовидной железы, предстательной железы и крови. Мастер гены выбирали с помощью анализа экспрессии с использованием микрочипов и построения компьютерной модели регуляции генов. При этом, как и в нашем случае, проведенные [163] исследования подтвердили, что экспрессия мастер генов в образцах одного и того же вида рака значительно отличалась у разных пациентов.

#### **4.2. Выбор модельных систем для исследования роли мастер генов при раке ПЖ**

В качестве предварительного этапа исследований мы подробно охарактеризовали спектры экспрессии генов транскрипционных факторов поджелудочной железы и генов маркирующих эпителиальные и мезенхимальные характеристики в образцах клеточных линий РПЖ.

В работе использовали клеточные линии ПАПЖ, различающиеся так называемой степенью злокачественности («tumor grade», от высокой «High grade»- до низкой («Low grade»)). Степень злокачественности согласуется с уровнем гистологических преобразований ткани, из которой происходит рак, и отражает способность раковых клеток экспрессировать специфичные этой ткани гены. Низкая степень (Low grade) злокачественности соответствует высокодифференцированным клеткам (well differentiated), которые имеют много сходств с нормальными клетками и значительно медленнее пролиферируют и распространяются, чем плохо дифференцированные (poorly differentiated) или недифференцированные (Undifferentiated) раковые клетки. Промежуточная степень соответствует умеренно дифференцированному клеточному фенотипу и является переходной стадией к высокой степени злокачественности. Высокая степень злокачественности характеризуется плохо дифференцированным или недифференцированным клеточным фенотипом, при котором клетки теряют специализированные, свойственные зрелым структурам, свойства и функции. Недифференцированные раковые клетки часто делятся и быстро распространяются. Высокая степень злокачественности опухолей часто связана с плохим прогнозом для пациентов [165], [166].

Важно отметить, что выделяют три подтипа ПАПЖ [165], [166]:

- «классическому» подтипу свойственна низкая степень злокачественности, лучший прогноз и высокий уровень экспрессии эпителиальных генов и генов клеточной адгезии;

- «квазимезенхимальный» подтип характеризуется высокой степенью злокачественности опухолей, худшим прогнозом и высоким уровнем экспрессии мезенхимальных генов;

- менее распространенный «экзокринный» подтип, при котором активно экспрессируются гены, специфичные ацинусам ПЖ.

Модельные клеточные линии ПАПЖ принадлежат к классическому и квазимезенхимальному подтипам. В данной работе использовали следующие клеточные линии:

- Для линии MiaPaCa-2 характерна низкая степень дифференцированности клеток и формирование многослойных агрегатов при культивировании *in vitro* [167]. Клетки этой линии морфологически похожи на фибробласты, могут быть как крупные, так и мелкие клетки в культуре, выраженных адгезионных контактов не образуют [168]. Для клеток линии MiaPaCa2 характерны мутации в онкогенах *KRAS*, *p53*, *p16INK4A* и онкоген *SMAD4/DPC4* дикого типа [169]. Клетки линии MiaPaCa2 экспрессирует CK5.6, AE1 / AE3, E-кадгерин, виментин, хромогранин А, синаптофизин, SSTR2 и NTR1, но не CD56. Эти клетки являются эпителиальными, поскольку они экспрессируют CK5.6, AE1 / AE3 и E-cadherin с мезенхимальными характеристиками, поскольку они экспрессируют виментин [170].

- Клетки линии PANC-1 относят к низкодифференцированным клеткам с неправильной форма [167]. Морфологически выделяют три типа клеток: крупные клетки, промежуточные стеллатные клетки (звездчатые) и мелкие клетки [168]. Они образуют радиальные E-кадгериновые межклеточные контакты, нехарактерные для эпителиальных клеток, которые чаще наблюдаются в клетках на стадии ЭМП. Клетки PANC-1 являются клетками с эпителиальными характеристиками, поскольку они экспрессируют CK5.6 и AE1/AE3, мезенхимальные характеристики, поскольку они экспрессируют виментин. Для клеток линии PANC-1 характерны мутации в онкогенах *KRAS*, *p53* и онкогены *SMAD4/DPC4* и *p16INK4A* дикого типа [169], [171].

- Культура AsPC-1 была получена из асцита больного раком ПЖ и характеризуется пониженной степенью дифференцировки по сравнению с дифференцированными VxPC-3 и Саран-2. Клетки AsPC1 имеют фибробластоподобную форму и почти не образуют адгезионных контактов. Клетки линии AsPC-1 экспрессируют E-кадгерин, муцин и раково-эмбриональный антиген [170]. Для клеток линии AsPC1 характерны мутации в онкогенах *KRAS*, *p53*, *p16INK4A* и онкоген *SMAD4/DPC4* дикого типа [169], [171].

- Культура ВхРС-3 была получена из высокодифференцированной ПАПЖ, не образующей метастазы. Клетки линии ВхРС-3 обладают эпителиальной морфологией, для них характерен рост плотными кластерами, они экспрессируют Е-кадгерин [172], карциноэмбриональный антиген, антиген, ассоциированный с раком поджелудочной железы человека, специфический для человека поджелудочный антиген [170]. В клетках ВхРС-3 отсутствует мутации в KRAS и p16INK4A, хотя они обычно встречается при раке поджелудочной железы, но характерны мутации в онкогенах p53 и SMAD4/DPC4 [169], [171].

- Клетки линии Саран-2 получены из высокодифференцированной ПАПЖ и обладают наибольшей степенью дифференцировки из выбранных культур; для них характерна эпителиальная морфология, формирование монослойных островков с ярко выраженными Е-кадгериновыми контактами, наблюдается экспрессия цитокератинов-7, -8, -17 и -18. В клетках Саран2 отсутствует мутации p53, p16INK4A и SMAD4/DPC4, часто встречающиеся при раке поджелудочной железы, но присутствует мутантный KRAS [169], [171].

Мы исследовали уровень экспрессии ряда генов факторов транскрипции и содержание их белковых продуктов в пяти раковых линиях клеток поджелудочной железы с одновременным контролем экспрессии генов-маркёров эпителиального и мезенхимального состояния клеток методами количественной ПЦР в реальном времени и Вестерн-блоттинга. Практически для всех изученных генов и для всех линий клеток высокий уровень транскрипции гена совпадал с высоким содержанием белка, и, наоборот, отсутствие или низкий уровень содержания белка сопровождалось низким содержанием мРНК соответствующего гена. Относительный уровень транскрипции выбранных генов определяли относительно референсных генов *18SPHK*, *EEF1a* и *HPRT*.

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

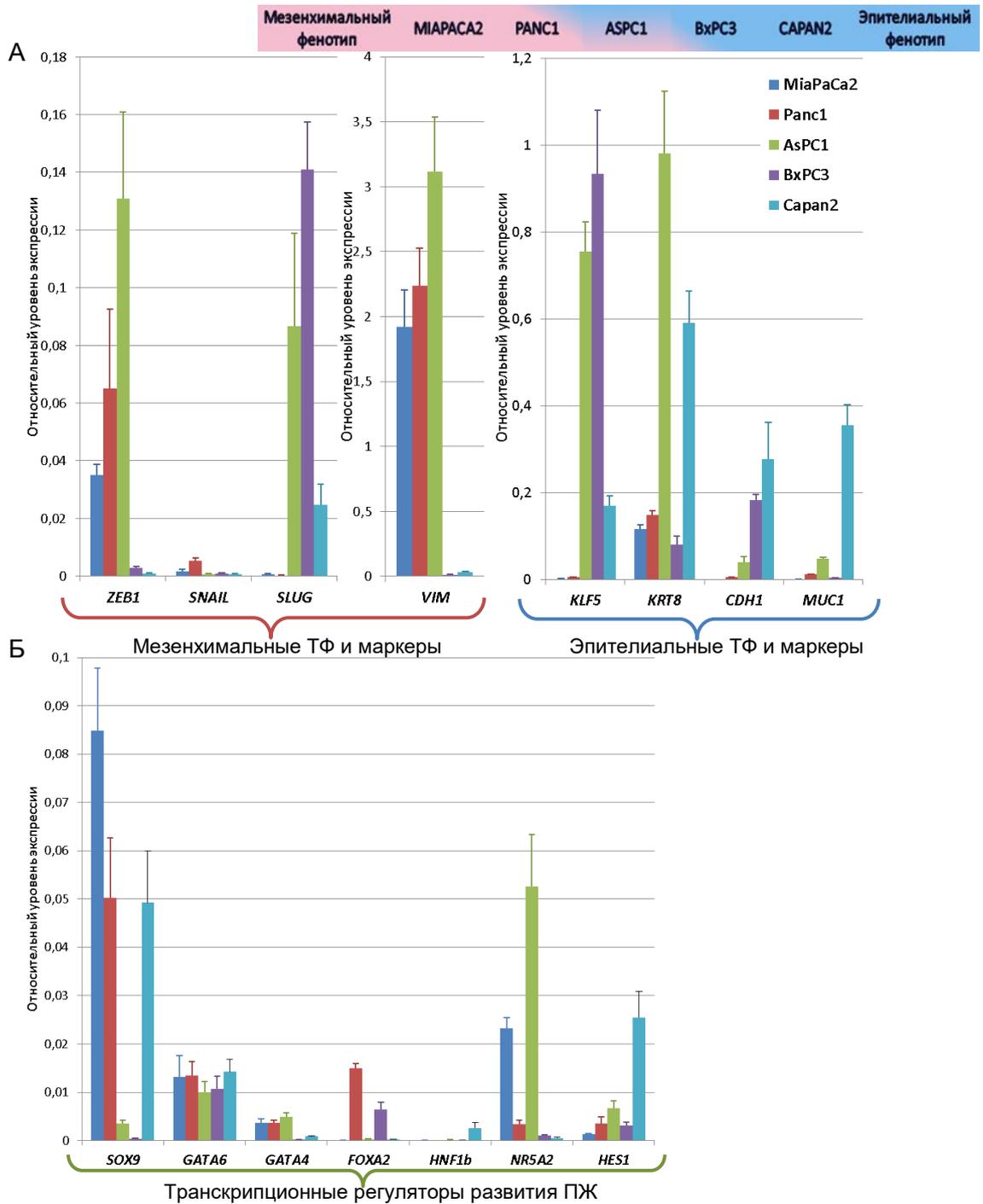
В качестве эпителиальных маркёров мы использовали ген *CDH1* и его продукт Е-кадгерин, а также гены *KRT8* и *MUC1* и кодируемые ими белки, экспрессия которых характерна для клеток эпителиального типа [173]. Также в группу «эпителиальных» генов был включен ген транскрипционного фактора *KLF5*, характерного преимущественно для эпителиальных клеток [174]. В качестве мезенхимального маркёра был выбран ген *VIM* и его продукт виментин, а также гены и белки транскрипционных факторов *SNAIL*, *SLUG* и *ZEB1*, по литературным данным активно экспрессирующиеся в мезенхимальных клетках [175].

Мы показали (Рис. 9.А), что в клетках линий MiaPaCa-2 и PANC-1 было снижено содержание транскриптов генов эпителиальных маркеров *CDH1*, *KRT8*, *MUC1* и гена

эпителиального транскрипционного фактора KLF5, повышен уровень содержания мРНК генов мезенхимальных транскрипционных регуляторов ZEB1 и SNAIL и мезенхимального маркера виментина, что указывало на их квазимезенхимальный фенотип. И 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 эпителиальных генов CDH1 и KLF5 и гена мезенхимального транскрипционного фактора SLUG и сниженное 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.

Для дальнейшего анализа экспрессии генов в клетках пяти линий рака поджелудочной железы, были выбраны мастер гены: *PDX1*, *PTF1a*, *SOX9*, *GATA4*, *HNF1b*, и связанные с ними в регуляторных сетях гены транскрипционных регуляторов развития поджелудочной железы: *GATA6*, *FOXA2*, *HES1*, *NKX6.1*, *NR5A2* (Рис. 9.Б.)



**Рис. 9. А.** Относительные уровни экспрессии эпителиальных и мезенхимальных транскрипционных факторов (ТФ) и маркеров в модельных клеточных линиях ПАПЖ. **Б.** Относительные уровни экспрессии мастер регуляторов эмбрионального развития ПЖ в модельных клеточных линиях ПАПЖ. Клеточные линии расположены слева направо от самых мезенхимальных недифференцированных MiaPaCa-2 к более эпителиальным хорошо дифференцированным клеткам Capan-2. Барами обозначена стандартная ошибка среднего (SEM).

В изученных клеточных линиях отсутствует или находится на очень низком уровне экспрессия генов *PDX1*, *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 и PANC1 и промежуточной линии AsPC-1 и понижен в эпителиальных VхРС-3 и Саран-2. Уровень экспрессии гена *SOX9* в линиях от наименее дифференцированной MiaPaCa-2 к дифференцированной VхРС-3 снижается, за исключением линии Саран-2, в которой обнаружен высокий уровень.

#### **4.3. Индукция эпителиально-мезенхимального перехода в клетках рака поджелудочной железы под действием TGFβ1**

Чрезвычайно важную роль в панкреатическом канцерогенезе как и в других злокачественных опухолевых процессах играет эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), [176] обратимое превращение эпителиальных клеток в мезенхимальные клетки, обладающие повышенной инвазивностью, увеличенной миграционной способностью, устойчивостью к апоптозу и высоким уровнем синтеза компонентов внеклеточного матрикса.

В процессе ЭМП опухолевые клетки могут приобретать способность к инфильтрации в окружающую нормальную ткань, инициируют процесс метастазирования и высокую устойчивость к химиотерапевтическим препаратам [177]. При развитии злокачественных новообразований раковые клетки часто проявляют свойства эмбриональных стволовых клеток, что возможно связано с функционированием одних и тех же регуляторных и сигнальных систем как при дифференцировке эмбриональных тканей, так и при росте дедифференцированных опухолевых образований.

В процессе ЭМП участвует множество сигнальных путей, в частности TGFβ, который является ключевым регулятором плюрипотентности, пролиферации и дифференцировки клеток многоклеточных. TGFβ в зависимости от сочетания факторов окружающей среды может индуцировать апоптоз раковых клеток и подавление опухоли, или, наоборот, вызвать ЭМП, что способствует инвазии раковых клеток и метастазированию [178]. Для ЭМП характерно снижение уровня экспрессии маркеров эпителиальной принадлежности, например, белков межклеточных контактов клаудинов, окклюдина и E-кадгерина, реорганизация цитоскелета, включающая замену цитокератиновых филаментов на виментиновые, и увеличение экспрессии генов матриксных металлопротеиназ, участвующих в ремоделировании внеклеточного

матрикса. В изменение профилей экспрессии генов во время ЭМП вовлечено несколько важных ЭМП специфических транскрипционных регуляторов, в частности, транскрипционные репрессоры семейств SNAIL (SNAIL1 и SLUG), ZEB (ZEB1 и ZEB2) и TWIST [179]. ЭМП вовлекает также и транскрипционные факторы, которые важны для эмбриогенеза и канцерогенеза [180].

Исходя из сложности процесса для того чтобы вычлениить влияние TGF $\beta$  на конкретные гены рака поджелудочной железы необходимо использование модельных систем. В качестве модельной системы, на которой возможно воспроизвести существенные детали процесса ЭМП в раковых клетках, нами была выбрана клеточная линия протоковой аденокарциномы поджелудочной железы PANC-1. Клеточная линия PANC-1 характеризуется мутациями в генах *KRAS*, *INK4A*, *INK4B* и *TP53*, присутствующими в большинстве видов рака поджелудочной железы, и, что существенно для целей данной работы, немутированным рецептором TGF $\beta$ RI, и в отличие от большинства других клеточных линий протоковой аденокарциномы, функциональным SMAD-комплексом. В соответствии с профилями транскрипции генов [166] клеточная линия PANC1 относится к квази-мезенхимальному типу. "Квази-мезенхимальный" подтип связан с более развитыми опухолями, умеренно-дифференцированными клетками и плохим прогнозом.

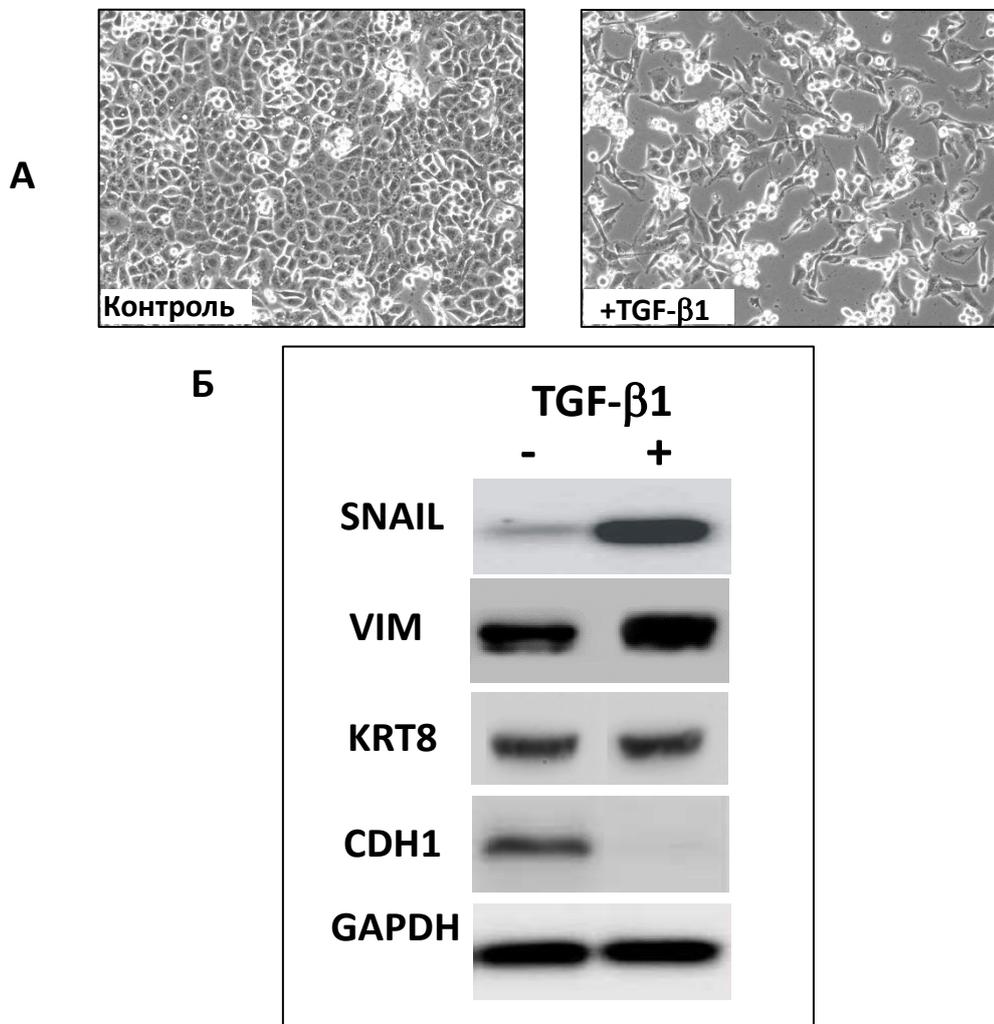
Для исследования возможной роли транскрипционных факторов, координирующих эмбриональное развитие поджелудочной железы, в ЭМП проводили индукцию клеток линии PANC-1 фактором в течение 120 часов, после чего анализировали фенотип клеток, экспрессию белков и генов.

#### **4.3.1 Характеристика фенотипа клеток и экспрессии белков-маркёров эпителиального и мезенхимального состояния клеток при индукции клеток линии PANC-1 фактором TGF $\beta$ 1**

Через 120 часов культивирования клеток линии PANC-1 в среде, содержащей TGF $\beta$ 1, наблюдали изменение морфологии клеток: приобретение ими фибробластоподобной формы, характерной для мезенхимальных клеток, потери межклеточных контактов и обособления их друг от друга, что может свидетельствовать о вступлении клеток в процесс ЭМП. В качестве контроля использовали клетки линии PANC-1, которые культивировали в такой же среде, но без добавления TGF $\beta$ 1. В этих клетках ЭМП-подобных изменений не наблюдали, клетки сохраняли эпителиальный фенотип и межклеточные контакты (Рис. 10. А).

На Рис. 10.Б представлен Вестерн-блот анализ лизатов клеток PANC-1, обработанных фактором TGF $\beta$ 1 и контрольных необработанных клеток. Показано значительное увеличение количества белка SNAIL и существенное снижение экспрессии самого E-кадгерина. На

продукцию белков промежуточных филаментов цитокератина 8 и виментина добавление в культуральную среду TGF $\beta$ 1 не повлияло. Белок SNAIL является транскрипционным репрессором E-кадгерина, повышение его уровня экспрессии и потеря экспрессии белка межклеточных контактов E-кадгерина – одни из ключевых событий ЭМП.

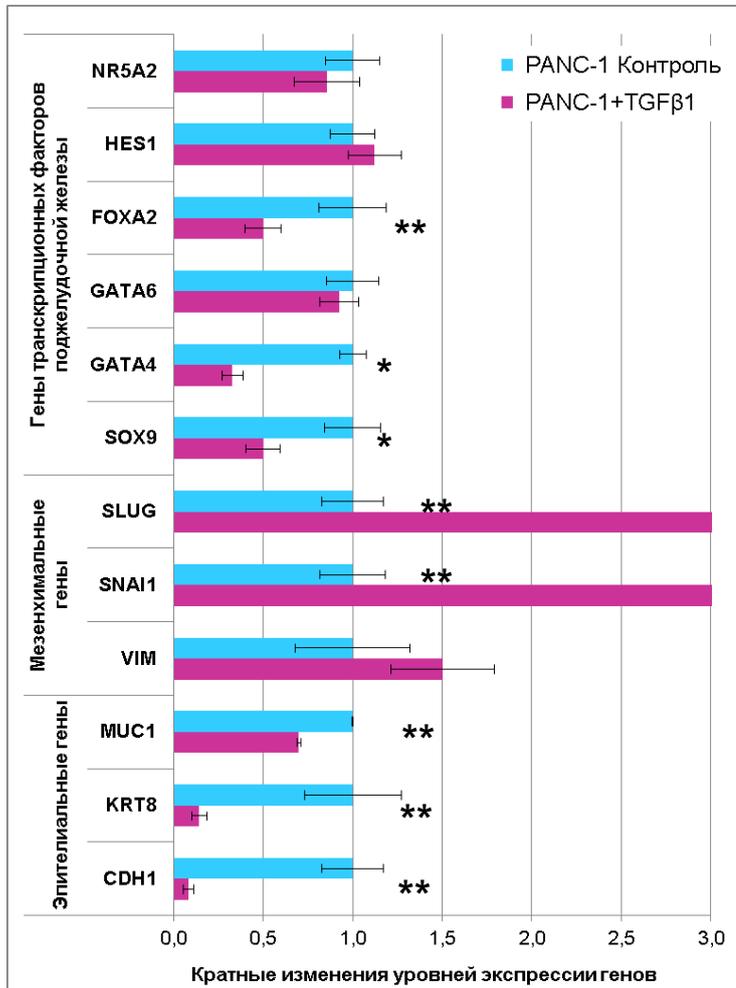


**Рис. 10.** Микрофотографии контрольных клеток линии PANC-1 (Контроль) и клеток, индуцированных TGF $\beta$ 1 в течение 120 часов (+TGF $\beta$ 1). Б. Вестерн-блот анализ белков SNAIL, VIM, KRT8 и E-кадгерина в лизатах клеток линии PANC-1, стимулированных TGF $\beta$ 1 (+) и не обработанных фактором, после 120 ч инкубации.

#### 4.3.2. Изменение экспрессии генов-маркеров ЭМП и мастер генов развития поджелудочной железы при индукции клеток линии PANC-1 фактором TGF $\beta$ 1

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*, *HNFB*, *NEUROG3*, *HES1*, *ONECUT1*, *NKX6.1*, *NR5A2*, *RBPJL*. На Рисунке приведены результаты анализа относительного уровня экспрессии эти генов.



**Рис. 11.** Кратные изменение уровней экспрессии генов-маркеров ЭМП и мастер генов развития поджелудочной железы при индукции клеток линии PANC-1 фактором TGFβ1. Барами обозначена стандартная ошибка среднего (SEM). \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$

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

Для 13 генов мастер факторов эмбрионального развития ПЖ показано (Рис. 11):

1. 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.

2. Неизменность экспрессии генов *HES1*, *NR5A2*, *GATA6* при ЭМП до и после инкубации клеток с TGFβ1.

3. Снижение уровня экспрессии генов *SOX9*, *FOXA2* в 2 раза и *GATA4* в 3 раза при инкубации клеток с TGFβ1.

Транскрипционный фактор SOX9 выполняет множество функций, как во время эмбриогенеза, так и во взрослом организме, среди которых поддержание недифференцированного фенотипа клеток и их способности к пролиферации. Экспрессия SOX9 повышена во многих типах опухолей. В ранее проведенных исследованиях влияния TGFβ-сигнального каскада на SOX9 было выявлено, как увеличение, так и снижение уровня его экспрессии [181] в различных типах клеток. Кроме того, показано, что сверхэкспрессия SOX9 может промотировать ЭМП [76].

Для гена *FOXA2* нами показано 5-ти кратное снижение количества транскриптов в обработанных TGFβ1 клетках по сравнению с контрольными. Белок FOXA2 относится к пионер факторам развития поджелудочной железы и печени, которые через изменение конформации хроматина, способствуют связыванию других транскрипционных факторов с регуляторными областями генов [182]. Ранее была установлена ассоциация высокого уровня экспрессии *FOXA2* с эпителиальным фенотипом и низкого - с мезенхимальным. Была продемонстрирована роль FOXA2 как репрессора SLUG. Показано понижение инвазивности клеток и снижение TGFβ-индуцированного эпителиально-мезенхиального перехода при повышенной экспрессией FOXA2, кроме того была высказана гипотеза о роли FOXA2 в качестве супрессора метастазирования опухолей через ингибирование ЭМП [183]. Также известно, что в промоторе гена *FOXA2* есть сайт связывания со SMAD3, эффектором TGFβ-сигнального пути, который и осуществляет подавление транскрипции *FOXA2* в ответ на добавление TGFβ [184]. Полученные нами данные позволяют выдвинуть гипотезу что подавление экспрессии *FOXA2* является одним из механизмов ЭМП при индукции TGFβ1 в используемой нами модели.

Для гена GATA-связывающего транскрипционного фактора *GATA4* в нашей работе было показано снижение экспрессии в 4 раза в клетках линии PANC-1, стимулированных TGFβ1. *GATA4*, как и FOXA2, относят к пионер факторам эмбриогенеза, которые привлекаются к молчащему хроматину в мультипотентных прогениторных клетках и способствуют созданию компетенции для дифференцировки клеток [182]. Ген *GATA4* демонстрирует повышенную

экспрессию в опухолевых клетках, в частности при РПЖ. Описан синергизм действия фактора *GATA4* и TGF $\beta$ -сигнального пути [185].

#### **4.4. Исследование влияния экзогенной экспрессии PDX1 на злокачественный потенциал культур низкодифференцированных клеток PANC-1 и высокодифференцированных клеток VxPC-3**

В качестве первого этапа проверки гипотезы о возможном противоопухолевом действии гена *PDX1* мы исследовали влияние экзогенной экспрессии гена *PDX1* в клетках ПАПЖ человека линий PANC-1 и VxPC-3, для которых характерно отсутствие экспрессии эндогенного PDX1.

Ранее исследователями были проведены эксперименты по воздействию на PDX1 в качестве мишени для терапии. В работе [186] были разработаны различные методы ингибирования экспрессии *Pdx1*, что приводило к увеличению выживаемости в мышинных моделях PDAC. Авторы высказали убеждение, что стратегии, нацеленные на терапию PDX1, позволят осуществлять лечение этой болезни. Однако эти данные вызвали критику другой группы исследователей [94], которые показали, что PDX1 является контекстно-зависимым медиатором инициирования и прогрессирования PDAC. По их данным определение PDX1 как полностью про-или противоракового фактора является неверным и без дальнейшего понимания его разнообразных функций, рассматривать его как терапевтическую мишень, как было предложено [186], является преждевременным. Белок PDX1 имеет решающее значение для развития рака, но его блокирование может привести к более агрессивным опухолям. Необходимы дополнительные исследования для определения того, как PDX1 взаимодействует с различными корегуляторами, и модулирует критические аспекты формирования рака [94].

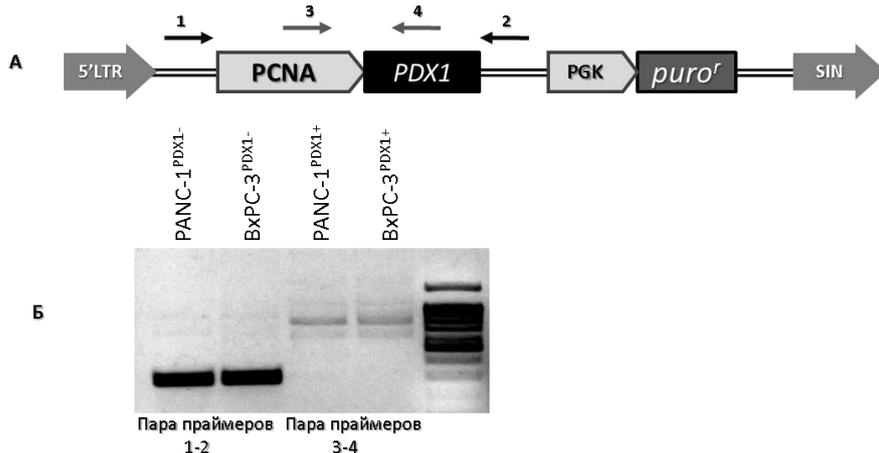
Против необходимости попыток [186] достижения терапевтического эффекта при помощи подавления экспрессии *Pdx1*, говорит и тот факт, что самые агрессивные виды рака имеют самые низкие уровни PDX1. Наихудшие прогнозы имели пациенты, у которых опухоли не имели PDX1 [94].

В связи с этим возникает вопрос, может ли генотерапевтическая доставка PDX1 в опухоли с низким содержанием этого белка иметь терапевтическую ценность.

##### **4.4.1. Получение клеточных культур PANC-1 и VxPC-3, экзогенно экспрессирующих PDX1**

Клетки линий PANC-1 и VxPC-3 заражали лентивирусными частицами, несущими вектор, содержащий ген устойчивости к пурамицину и кодирующую часть гена *PDX1* под контролем

PCNA промотора (Рис. 12.А) или вектор несущий только ген устойчивости. После заражения вирусными частицами и последующей селекции в среде с пуромицином были получены культуры этих клеток, экзогенно экспрессирующие ген *PDX1* (PANC-1<sup>PDX1</sup> и ВхРС-3<sup>PDX1</sup>). В качестве контрольных клеток использовали клетки PANC-1 и ВхРС3-, трансдуцированные лентивирусом, не содержащим ген *PDX1* (PANC-1<sup>Контроль</sup> и ВхРС-3<sup>Контроль</sup>). Интеграцию вируса в геномную ДНК клеток оценивали с помощью ПЦР-анализа (Рис. 12.Б)

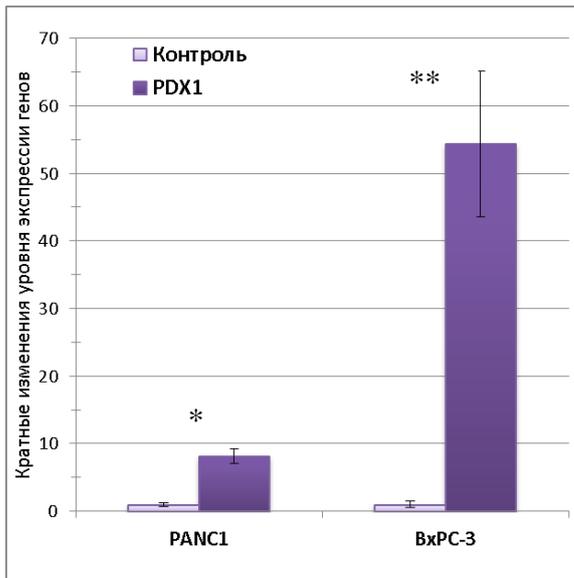


**Рис. 12. А.** Схематическое изображение полученных в работе лентивирусных конструкций. Конструкции содержат экспрессионные кассеты, в которых ген *PDX1* находится под PCNA. Контрольная конструкция не содержит промотора и гена *PDX1*. На схеме указаны пары праймеров 1-2 и 3-4, использованные для подтверждения прохождения интеграции лентивируса в геном. **Б.** ПЦР-анализ геномной ДНК полученных при трансдукции клеток. Для контрольных клеток PANC1 и ВхРС-3 использовали пару праймеров 1-2 (продукт 296 пн, амплификация участка без экспрессионной кассеты PCNA-PDX1), для клеток с экспрессионной кассетой *PDX1* – пару 3-4 (продукт 826 пн).

#### 4.4.2 Определение уровня экспрессии гена *PDX1* и его продукта в клетках PANC-1<sup>PDX1</sup> и ВхРС-3<sup>PDX1</sup>

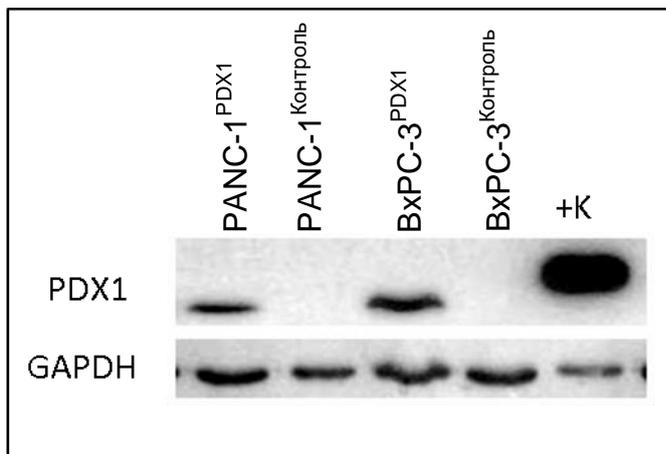
Первым этапом исследования клеток культур PANC-1<sup>PDX1</sup> и ВхРС-3<sup>PDX1</sup> стало определение уровней экспрессии в них гена *PDX1* с помощью количественного ОТ-ПЦР в реальном времени. Полученные результаты приведены на Рис. 13.

В клетках PANC-1<sup>PDX1</sup> и ВхРС-3<sup>PDX1</sup>, содержащих кассету PCNA-PDX1, показано увеличение уровня транскрипции гена *PDX1* в 8 и 54 раза, соответственно, по сравнению с клетками PANC-1<sup>Контроль</sup> и ВхРС-3<sup>Контроль</sup>, не содержащими кассету.



**Рис. 13.** Кратные изменения уровня экспрессии гена *PDX1* в клетках PANC-1<sup>PDX1</sup> и VxPC-3<sup>PDX1</sup> относительно контрольных клеток PANC-1<sup>Контроль</sup> и VxPC-3<sup>Контроль</sup>. Барями обозначена стандартная ошибка среднего (SEM). \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$

Анализ уровня синтеза PDX1 в исследованных клеточных культурах PANC-1<sup>PDX1/Контроль</sup> и VxPC-3<sup>PDX1/Контроль</sup> проводили с помощью вестернблоттинга со специфическими к PDX1 антителами. Результаты иммуноблоттинга представлены на Рис. 14. Для контроля количества белка, внесенного в каждую пробу, мембраны окрашивали антителами к глицеральдегид-фосфат-дегидрогеназе (GAPDH).



**Рис. 14.** Уровни синтеза белка PDX1 в клетках PDX1-экспрессирующих и контрольных культур PANC-1 и VxPC-3. В качестве позитивного контроля (+K) использовали лизаты клеток линии HEK293T, транзientно трансфицированные плазмидой pCMV6-PDX1-FLAG. Уровни синтеза белка GAPDH использовали для контроля общего количества белка, нанесенного на дорожки.

Как видно из представленного рисунка, в образцах клеток PANC-1<sup>PDX1</sup> и VxPC-3<sup>PDX1</sup> уровень PDX1 значительно повышен по сравнению с образцами контрольных культур.

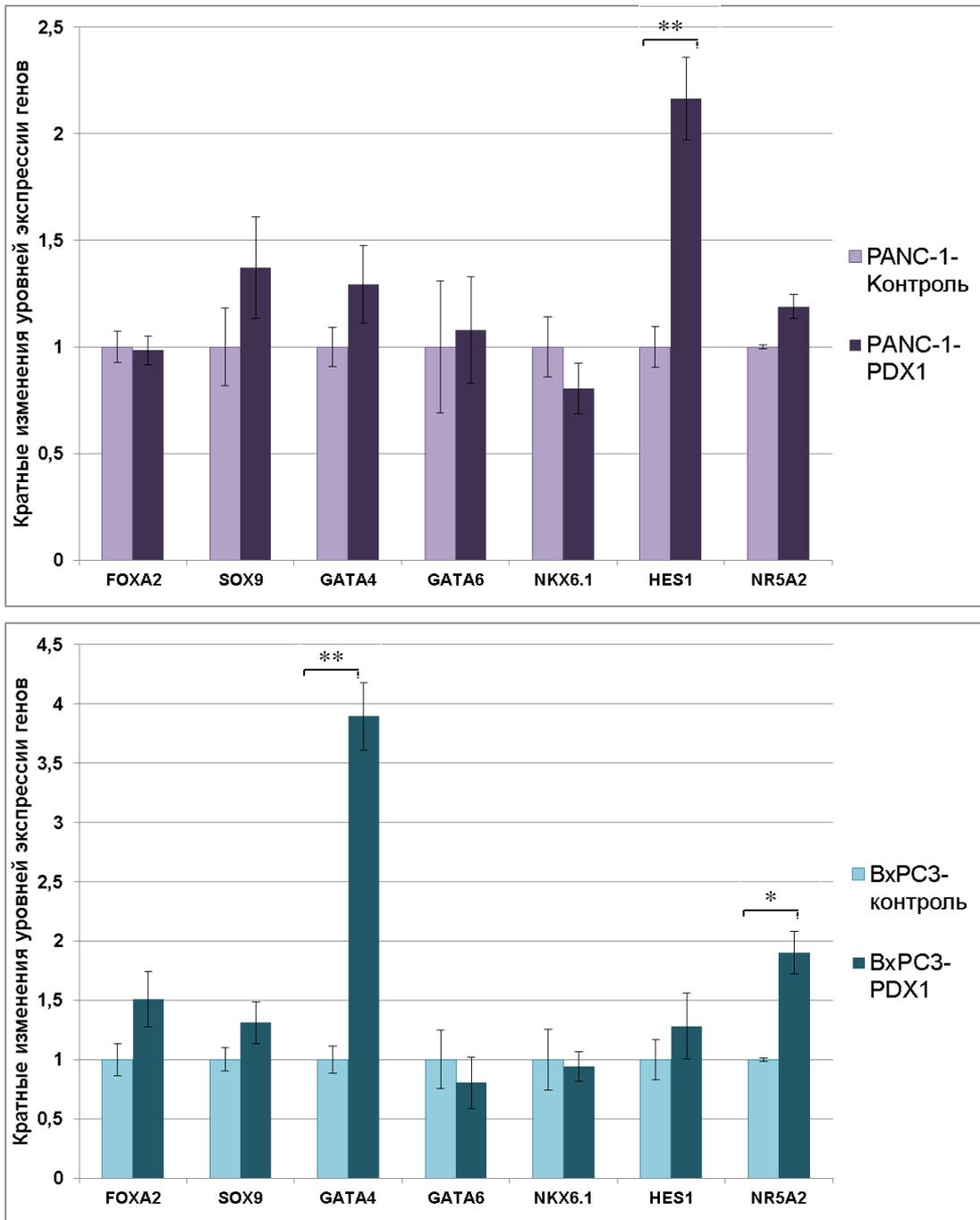
#### 4.4.3 Изменения экспрессии тканеспецифических транскрипционных факторов в клетках PANC-1<sup>PDX1</sup> и ВхРС-3<sup>PDX1</sup>

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 РПЖ, были выбраны 25 генов: 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*, *HNF1b*). Экспрессию генов анализировали с помощью ПЦР в реальном времени.

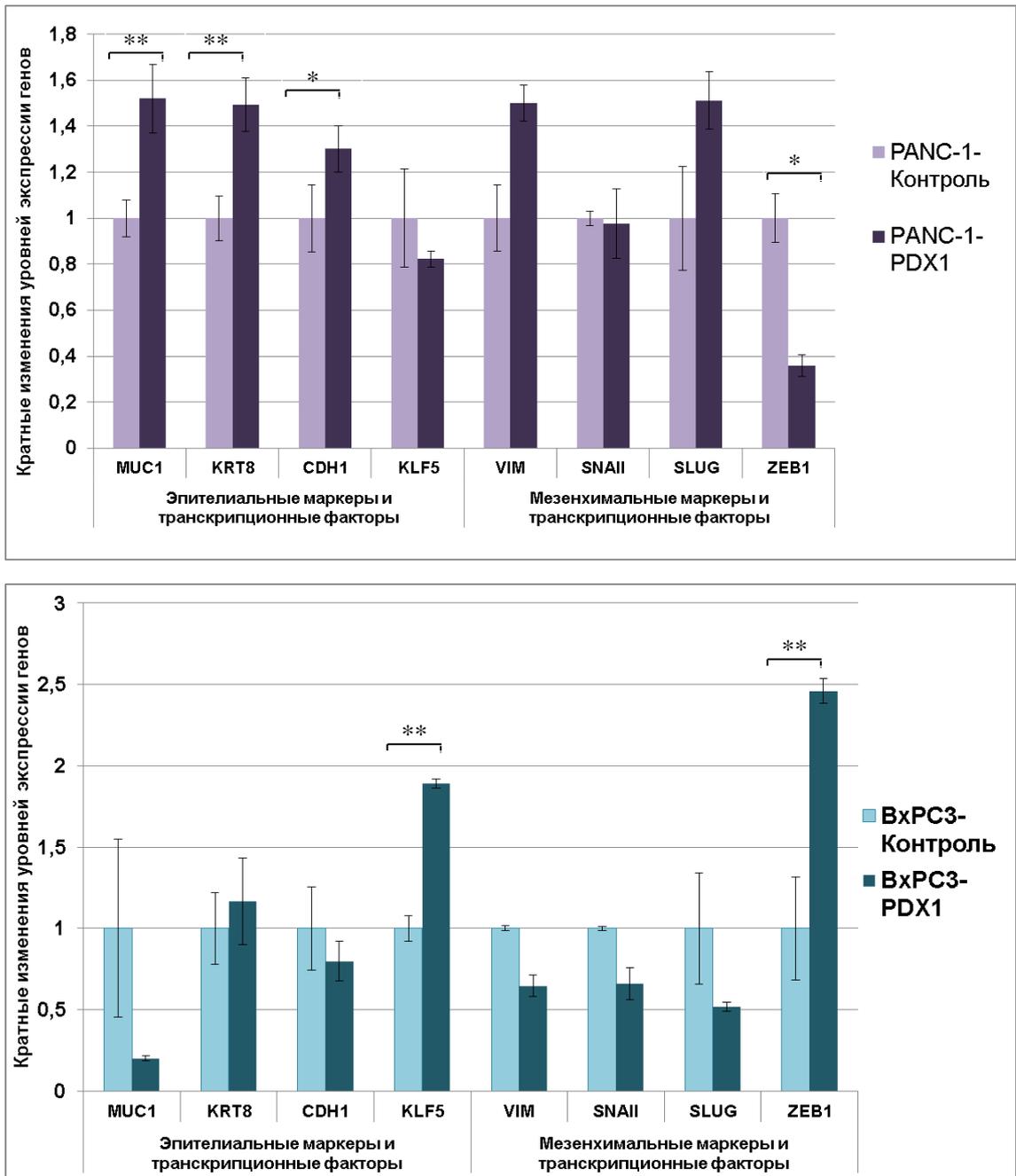
Экспрессия гена *PDX1* в клетках PANC-1<sup>PDX1</sup> и ВхРС-3<sup>PDX1</sup> не приводила к активации экспрессии мастер регуляторных генов *PTF1a* и *HNF1b*, эндокринных генов *ISL1*, *ONECUT1*, *INS1*, *GCG1* и *NEUROG3* и экзокринных генов *RBPJL*, *AMY2* и *CELA2*. Для остальных генов было проведено сравнение уровней экспрессии в клетках, экспрессирующих экзогенный PDX1, и в контрольных клетках, где экспрессия эндогенного PDX1 не детектировалась (Рис. 15 и 16).

В клетках PANC-1<sup>PDX1</sup> по сравнению с контрольными клетками PANC-1<sup>Контроль</sup> 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.

Полученные результаты показывают, что в клетках линии ВхРС3<sup>PDX1</sup> по сравнению с ВхРС3<sup>Контроль</sup> 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. 15.** Кратные изменения уровней экспрессии генов, специфично экспрессирующихся в поджелудочной железе в клетках линий PANC-1 и VxPC-3, экспрессирующих PDX1 и контрольных. Барами обозначена стандартная ошибка среднего (SEM). \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$



**Рис. 16.** Кратные изменения уровней экспрессии генов эпителиальных и мезенхимальных маркеров и транскрипционных факторов в клетках в клетках линий PANC-1 и VxPC-3, экспрессирующих *PDX1* и контрольных. Барами обозначена стандартная ошибка среднего (SEM). \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$

#### 4.4.4. Анализ содержания в локусах исследуемых генов гистоновых меток активных энхансеров и известных сайтов связывания PDX1

Различия в спектрах активности могут вызываться различными причинами, наиболее вероятной из которых представляется различие в состоянии энхансеров регулирующих данные гены.

Для проверки этой гипотезы был проведен анализ распределения гистонов со специфическими пост-трансляционными модификациями, характерными для различных функциональных состояний хроматина (энхансеров и промоторов), в локусах исследуемых генов, для которых наблюдались статистически значимые изменения экспрессии в клетках с экзогенной экспрессией PDX1. Для VxPC-3<sup>PDX1</sup> – это гены *KLF5*, *NKX6.1*, *NR5A2*, *ONECUT1*, *ZEB1*, *MUC1* и *SLUG*; для PANC-1<sup>PDX1</sup> - *ISL1*, *KRT8*. Были использованы ChIP-seq данные [165] о распределении гистонов H3K27ac (метка активных энхансеров/промоторов), H3K4me1 (метка активных энхансеров), H3K4me3 (метка активных промоторов) и H3K9me3 (метка «равновесных» энхансеров (poised enhancers)). Эти данные были получены для 6 линий ПАПЖ, с различной степенью дифференцированности, включая линию PANC-1. Мы показали, что в исследуемых локусах в высокодифференцированных линиях клеток (CFPAC1, CAPAN2, HPAF2 и CAPAN1), к которым относится и исследуемая нами линия VxPC3, суммарное содержание участков с метками активных энхансеров (H3K27ac и H3K4me1), как правило, выше, чем в низкодифференцированных линиях клеток (PANC-1 и MIA PaCa-2) (Табл. 5). Для распределений гистонов H3K4me3 и H3K9me3 каких-либо значительных различий между двумя типами клеточных линий не наблюдается (данные не приведены). Можно предположить, что более открытая структура хроматина в высокодифференцированных линиях ПАПЖ объясняет повышенную чувствительность клеток VxPC-3 к экзогенной экспрессии фактора транскрипции PDX1, в отличие от линии PANC-1.

Анализируя перекрытие областей, содержащих гистоны активных энхансеров – H3K4me1 и H3K27ac, мы определили как активные энхансеры (АЭ) участки, содержащие обе метки. Нами были выделены 3 типа энхансерных областей в исследуемых локусах: «Эпителиальные АЭ», обнаруженные только в высокодифференцированных линиях клеток; «Мезенхимальные АЭ», обнаруженные только в низкодифференцированных линиях; «Общие АЭ» – перекрывающиеся участки АЭ, обнаруженные в высоко- и низкодифференцированных линиях клеток. В таблице 3 показано содержание всех выделенных типов областей в исследуемых нами локусах. Как видно, во всех локусах содержится больше «Эпителиальных АЭ», кроме локусов *MUC1* и *KRT8*, в которых содержится больше «Общих АЭ». Интересно, что локусы генов *KLF5*, *NKX6.1*, *NR5A2*, *ONECUT1*, экспрессия которых повышалась в клетках

ВхРС-3<sup>PDX1</sup>, содержат в «Эпителиальных АЭ» известные сайты связывания PDX1 (Табл. 5), которые можно рассматривать как возможные мишени экзогенного PDX1 в клетках ВхРС-3<sup>PDX1</sup>, усиливающие экспрессию этих генов.

**Табл. 5.** Содержание в локусах исследуемых генов гистоновых меток активных энхансеров (H3K27ac и H3K4me1) в 6 линиях ПАПЖ и известных сайтов связывания PDX1.

Локус*	H3K27ac**						H3K4me1**						Сайты PDX1***				
	CFPAC1	SAPAN2	HPAF2	SAPAN1	PANC1	MIAPACA2	CFPAC1	SAPAN2	HPAF2	SAPAN1	PANC1	MIAPACA2	Всего	Области без АЭ	Общие АЭ	Мезенхимальные АЭ	Эпителиальные АЭ
KLF5	37.66	32.93	30.97	49.99	0.81	0.00	21.17	34.14	7.00	33.02	0.70	0.49	10	2			8
NKX6-1	4.31	7.86	2.97	4.70	2.23	0.00	3.75	10.96	7.59	4.99	2.94	1.34	4	3			1
NR5A2	5.36	2.46	12.77	13.30	5.51	3.59	10.88	5.85	26.44	15.30	7.83	1.85	10	9			1
ONECUT1	7.22	4.74	2.90	8.52	2.99	2.62	12.69	4.05	7.40	11.84	8.08	1.52	3	2			1
ZEB1	5.80	1.82	0.49	1.75	2.59	3.26	12.74	4.93	1.83	1.83	8.66	3.75	2	2			
MUC1	30.51	30.03	29.42	28.53	31.79	42.94	30.14	31.56	29.33	26.26	30.85	42.07	1			1	
SLUG	9.02	7.16	11.57	5.27	0.00	1.53	11.79	10.90	13.65	8.23	1.39	3.97	2	2			
ISL1	9.93	4.10	7.56	6.65	0.00	0.00	11.23	8.33	10.87	6.20	5.10	0.00	4	4			
KRT8	35.15	37.63	44.97	37.84	29.02	35.88	35.22	41.18	50.84	33.79	36.26	31.14	10	2	6	1	1

Шкала   
 (% от локуса)    0    5    10    ≥ 20

\* Координаты локусов были определены как координаты генов  $\pm 100$  т.п.н. Для генов, имеющих несколько вариантов, использовали самую левую и самую правую координаты. Использованы данные «UCSC genes» (<http://genome.ucsc.edu>) [187].

\*\* Содержание в локусах исследуемых генов гистоновых меток активных энхансеров (H3K27ac и H3K4me1) в 6 линиях ПАПЖ. Значения обозначают суммарную процентную долю участков, содержащих соответствующую гистоновую метку, от длин локусов.

\*\*\* Распределение известных сайтов связывания PDX1 в локусах исследуемых генов относительно активных энхансеров (АЭ).

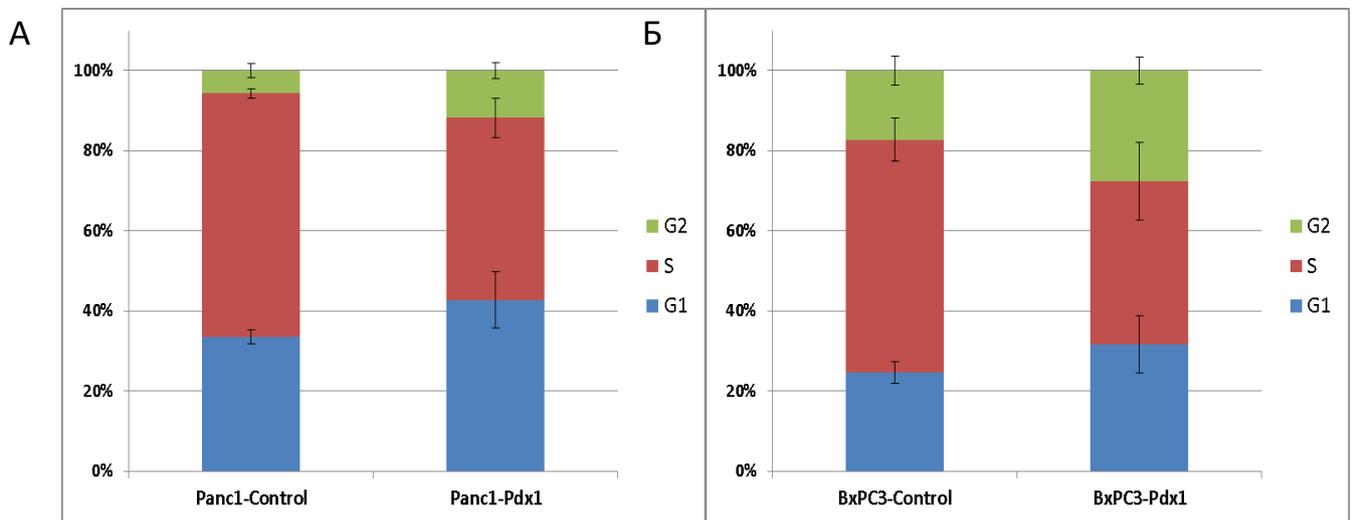
#### 4.4.5. Влияние экзогенной экспрессии PDX1 на пролиферативный потенциал клеток PANC-1 и ВхРС-3

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.

Высокая частота делений опухолевых клеток сопряжена с нарушениями функций белков-регуляторов клеточного цикла (например, циклин-зависимых киназ) или компонентов путей активации этих белков. Как правило, экзогенная экспрессия опухолевых супрессоров в неопластических клеточных культурах вызывает снижение скорости пролиферации этих клеток и увеличение доли клеток, подверженных апоптозу.

#### 4.4.5.1 Анализ клеточного цикла

Для того чтобы выявить возможное влияние экзогенной экспрессии PDX1 в клеточных культурах РПЖ на пролиферацию клеток, мы исследовали распределение клеток в культурах PANC-1<sup>PDX1</sup> и PANC-1<sup>Контроль</sup>, ВхРС-3<sup>PDX1</sup> и ВхРС-3<sup>Контроль</sup> по стадиям клеточного цикла. Принадлежность клеток к фазам определяли по количеству ДНК методом проточной цитофлуориметрии с использованием иодида пропидия.



**Рис. 17. А.** Распределение клеток PANC-1<sup>PDX1</sup> и PANC-1<sup>Контроль</sup> по фазам клеточного цикла. **Б.** Распределение клеток ВхРС-3<sup>PDX1</sup> и ВхРС-3<sup>Контроль</sup> по фазам клеточного цикла

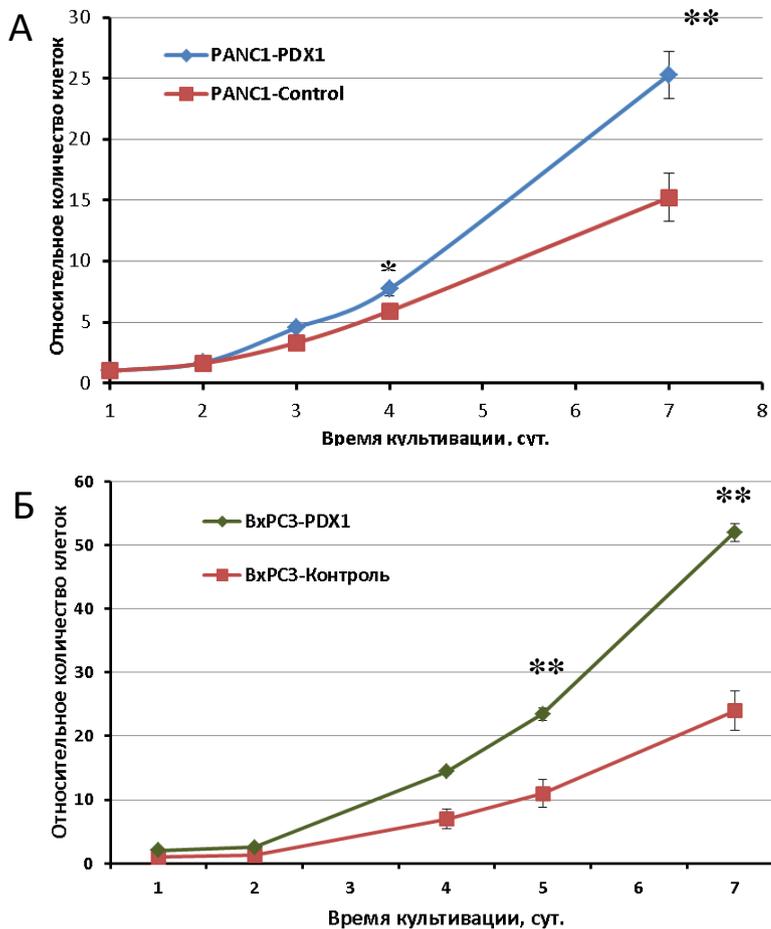
Было показано, что культуры трансдуцированных клеток, содержащих экспрессионные кассеты, отличаются от контрольных культур клеток по распределению по фазам клеточного цикла. Выявлено сокращение доли клеток PANC-1, экспрессирующих ген *PDX1*, находящихся в S-фазе до 45% по сравнению с 62% контрольных 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 PANC1<sup>PDX1</sup> 12% (Рис.17.А).

Для клеток ВхРС-3, 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 увеличение числа клеток, находящихся в G2 фазе: с 18% до 29%, и в G1 с 26% до 34% (Рис. 17.Б).

#### 4.4.5.2 Анализ скорости роста клеток

Для того чтобы выявить возможное влияние экзогенной экспрессии *PDX1* в клеточных культурах линий PANC-1 и ВхРС-3 на скорость их роста, мы исследовали кинетику роста этих культур *in vitro* при помощи MTS-теста. MTS тест основан на измерении оптической плотности клеточных сред после окраски живых клеток красителем MTS, образующим при окислении в митохондриях производное фиолетового цвета (формазан). На Рис. 18 приведены результаты определения относительного прироста клеток *PDX1*-экспрессирующих и контрольных культур PANC-1 и ВхРС-3.



**Рис. 18.** Кинетика роста *PDX1*-экспрессирующих культур PANC-1 (А) и ВхРС-3 (Б) и соответствующих контрольных культур. Данные нормированы относительно значений оптической плотности культур в первый день эксперимента. \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$  (критерий Манна-Уитни)

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.

Подобный эффект увеличения скорости пролиферации клеток описан для линии рака ПЖ MiaPaCa-2 в исследовании [186], а в норме PDX1 стимулирует деление  $\alpha$ - и  $\beta$ -островковых клеток ПЖ [188], [94]. Ранее было показано, что PDX1 способен стимулировать клеточную пролиферацию, ингибирование апоптоза и усиление клеточной инвазии [189], [93]. При сверхэкспрессии PDX1 наблюдается стимуляция экспрессии циклинов D1 и E, и циклин-зависимых киназ CDK2 и CDK4, и пониженная экспрессия p21, p27 и p53. Что может указывать на роль PDX1 в промотировании перехода клеточного цикла от стадии G1 к S [93].

#### **4.4.6. Влияние экзогенной экспрессии PDX1 на миграционный потенциал**

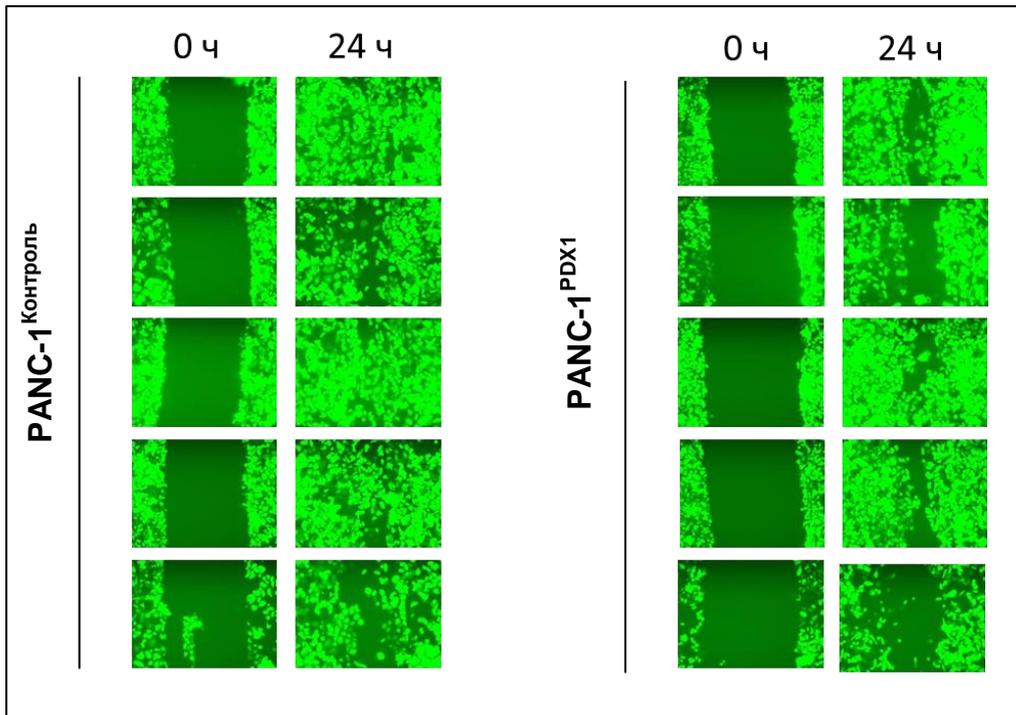
Клетки линии ВхРС-3 образуют монослойные островки с ярко выраженной эпителиальной морфологией, и предварительные эксперименты показали, что они не обладают подвижностью. Поэтому из экспериментов по изучению влияния фактора PDX1 на миграцию клеток эта линия была исключена. Таким образом, в следующих экспериментах изучали влияние экзогенной экспрессии PDX1 на миграционный потенциал культуры клеток PANC-1, содержащих экспрессионную кассету PCNA-PDX1.

##### **4.4.6.1. Оценка миграционного потенциала клеток PANC1<sup>PDX1</sup> в экспериментах по оценке ненаправленной и направленной миграции.**

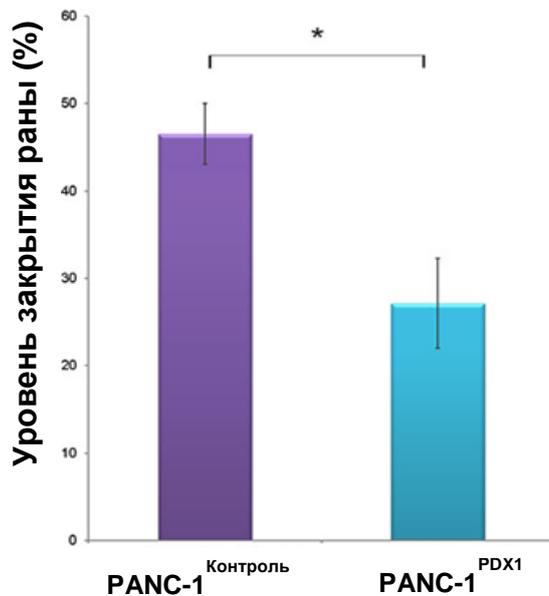
Для более удобной визуализации миграционного анализа и дальнейших экспериментов *in vivo* клетки PANC-1<sup>Контроль</sup> и PANC-1<sup>PDX1</sup> были трансдуцированы вирусом, содержащим ген GFP, и с помощью клеточного сортирования были отобраны клетки с удобным для дальнейшей детекции значением флуоресценции GFP. После сортирования был проведен вестерн блот анализ лизатов клеток, подтвердивший присутствие белка PDX1 в клетках PANC-1<sup>PDX1GFP</sup> (данные не приведены).

Влияние фактора PDX1 на миграцию, оценивали на модели механического повреждения или «раневой поверхности» монослойных культур PANC-1<sup>Контроль</sup> и PANC-1<sup>PDX1</sup> в течение 24 часов. После нанесения царапины на монослой клеток, области раны фотографировали с помощью флуоресцентного микроскопа ZOE. Спустя 24 часа наблюдали, как клетки мигрируют в область повреждения и заполняют пустую поверхность, и делали повторные снимки областей повреждения в тех же местах, для которых были получены микрофотографии сразу после

нанесения царапины. Динамика закрытия царапин представлена на Рис.19. Проводили 5 независимых биологических повторов эксперимента.



**Рис. 19.** Области раны на монослое клеток PANC-1<sup>Контроль</sup> и PANC-1<sup>PDX1</sup> сразу после нанесения царапины (0ч) и спустя 24 ч. Представлены 5 выборочных фото из 5 независимых экспериментов.

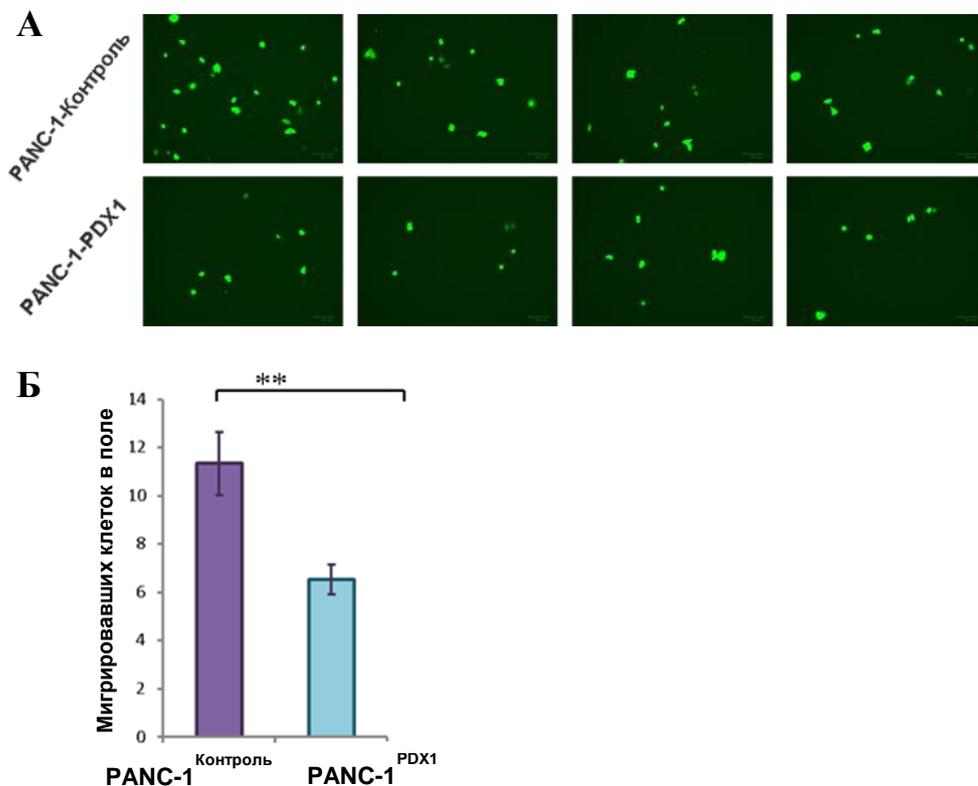


**Рис.20.** Процент «закрытия» клетками PANC-1<sup>Контроль</sup> и PANC-1<sup>PDX1</sup> области царапины через 24 часа относительно «начального состояния» в момент нанесения царапины. Барами обозначена стандартная ошибка среднего (SEM). \* -  $p < 0,05$

С помощью программы ImageJ анализировали количество занятого клетками PANC-1<sup>Контроль</sup> и PANC1<sup>PDX1</sup> места в областях царапины в момент нанесения и спустя 24 часа. На рисунке 15 представлены отношения площадей, занятых клетками PANC-1<sup>Контроль</sup> и PANC1<sup>PDX1</sup> через 24 часа после нанесения царапины и соответствующих площадей в начальный момент.

По сравнению с контрольными клетками «заращение» раны клетками PANC-1, экспрессирующими PDX1, было замедлено примерно в 2 раза (Рис. 20).

Для анализа способности клеток PANC-1, экспрессирующих PDX1, к направленной миграции проводили анализ 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 CO<sub>2</sub>-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 со встроенной цифровой камерой ZOE.



**Рис.21. А.** Мигрировавшие клетки PANC-1<sup>Контроль</sup> и PANC-1<sup>PDX1</sup> на нижней стороне мембраны вставки TransWell. Представлено 4 выборочных фото из 5 независимых экспериментов. **Б.**

Количество мигрировавших клеток в поле имэджера ZOE усредненное по 15 изображениям для PANC-1<sup>Контроль</sup> и PANC1<sup>PDX1</sup>.\*\* -  $p < 0,01$

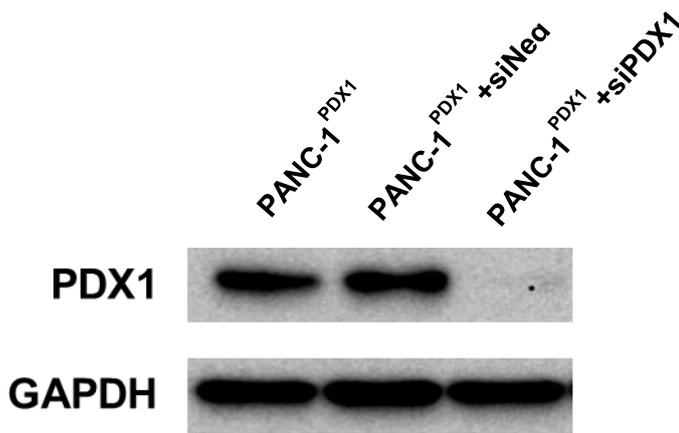
Анализ миграции клеток через систему TransWell показал, что число мигрировавших клеток PANC-1, экспрессирующих PDX1, было в 2 раза меньше, чем контрольных клеток обеих исследованных линий (Рис. 21 А и Б.).

Таким образом, эксперименты по направленной и ненаправленной миграции показали, что экспрессия в клетках линии PANC-1 гена мастер регулятора PDX1 приводит к двукратному снижению подвижности клеток, по сравнению с контрольными клетками не экспрессирующими PDX1.

#### ***4.6.2. In vivo анализ влияния экзогенной экспрессии PDX1 на метастатический потенциал клеток PANC1***

В качестве контроля для экспериментов *in vivo* использовали систему подавления экспрессии гена PDX1 с помощью малых интерферирующих РНК, комплементарных кодирующей части гена PDX1 (siPDX1). Связывание siPDX1 с молекулой мРНК PDX1 приводит к образованию шпильки, которая предотвращает трансляцию мРНК рибосомами и увеличивает скорость разрушения мРНК.

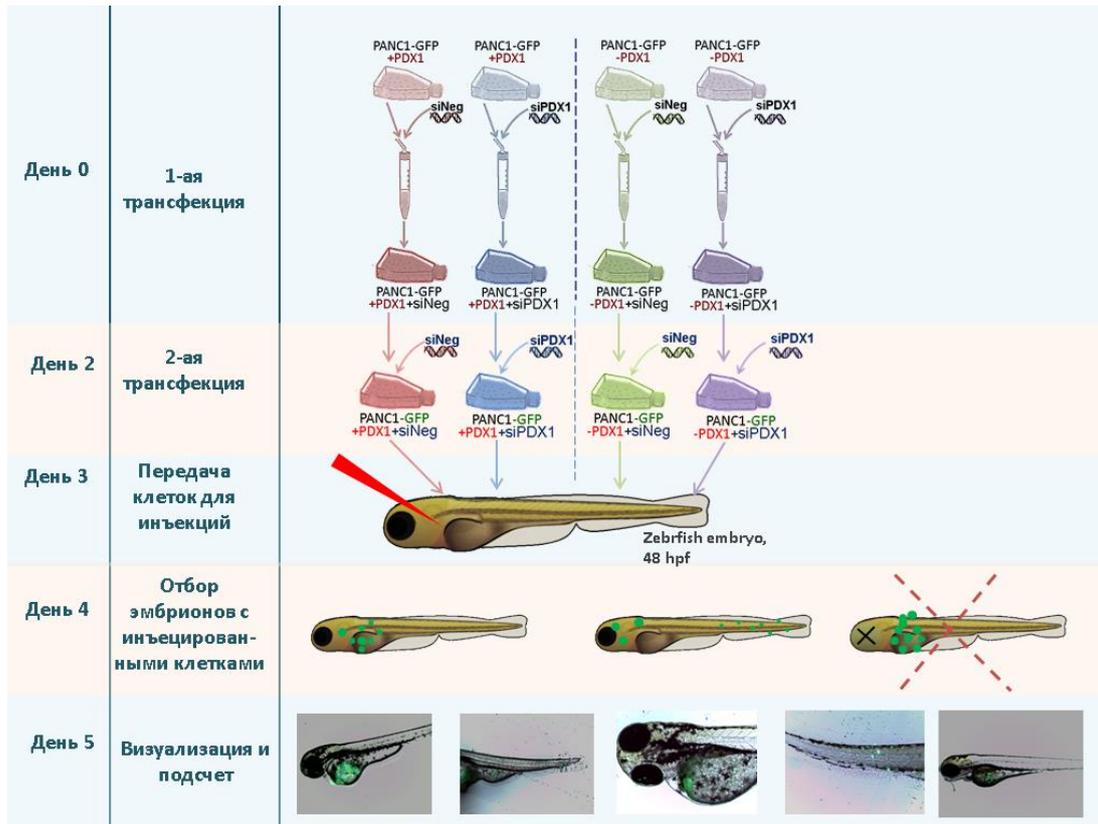
В работе была использована эквимольная смесь 3-х различных дуплексов малых интерферирующих РНК, комплементарных кодирующей части гена PDX1 и отличающихся участками связывания с молекулой мРНК PDX1, а также контрольную scramble последовательность, которая не имеет участков комплементарных в геномной ДНК человека. Транзientную трансфекцию клеток дуплексами siPDX1 и siNeg проводили с помощью Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen). Эффективность подавления экспрессии PDX1 в культурах PANC-1<sup>Контроль</sup> и PANC-1<sup>PDX1</sup>, оценивали методом иммуноблоттинга со специфическими антителами к белку PDX1. Для контроля количества белка, внесенного в каждую пробу, дополнительно проводили окрашивание мембраны антителами к глицеральдегид-фосфат-дегидрогеназе (GAPDH). Результаты определения уровней синтеза PDX1 представлены на Рис. 22.



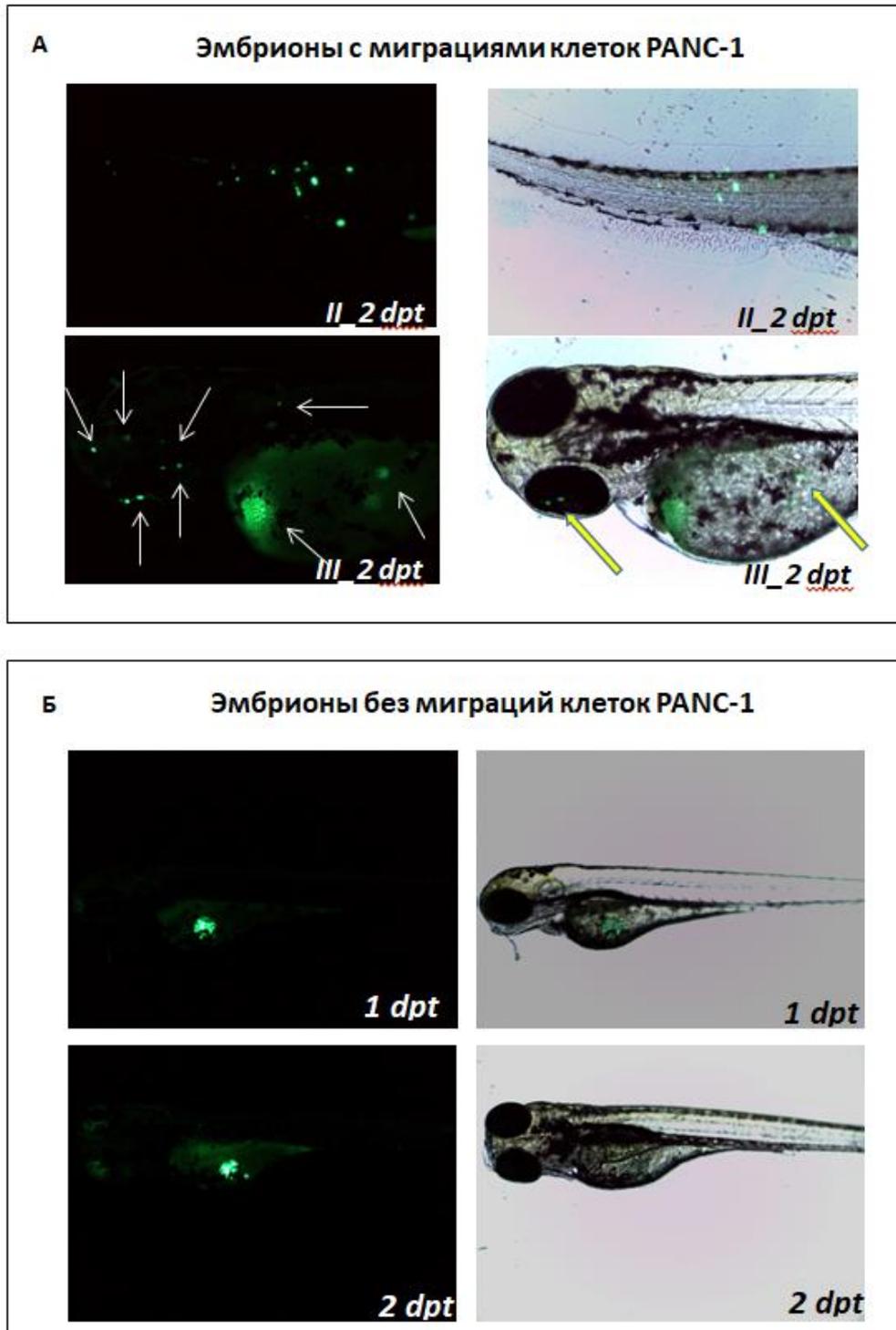
**Рис. 22.** Уровни синтеза белка PDX1 в клетках культур PANC-1<sup>PDX1</sup>, PANC-1<sup>PDX1</sup>-siNeg, PANC-1<sup>PDX1</sup>-siPDX1. Уровни синтеза белка GAPDH использовали для контроля общего количества белка, нанесенного на дорожки.

Для оценки функционального эффекта экзогенной экспрессии PDX1 на клетки PANC-1, мы использовали модель *in vivo* (эмбрионы *Danio rerio*, zebrafish), которая позволяла приблизить условия эксперимента к реальной ситуации. Иммунная система эмбрионов рыбок *Danio rerio* 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 в лаборатории белковой инженерии Института молекулярной генетики РАН. Схема эксперимента представлена на Рис. 23.

Нетрансфицированные клетки PANC-1<sup>Контроль</sup> и PANC-1<sup>PDX1</sup>, 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. Результаты анализа влияния эктопической экспрессии гена *PDX1* в клетках PANC-1 на метастатический потенциал представлены на Рис. 24 и Табл. 6.



**Рис. 23.** Схема проведения эксперимента на модели эмбрионов *Danio rerio*. Клетки линии PANC-1<sup>Контроль</sup> и PANC-1<sup>PDX1</sup>, экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок, в состоянии суспензии инкубировали с siPDX1 и siNeg, затем переносили в культуральные флаконы, через 48 часов проводили повторную трансфекцию и спустя еще 24 часа имплантировали в желточный мешок эмбрионов с помощью микроинъектора, позволяющего дозированно инъектировать объем суспензии, содержащий 250–300 клеток. Наличие клеток РПЖ в теле эмбриона, их пролиферация и локализация оценивались через 48 ч с помощью флуоресцентной микроскопии.



**Рис. 24.** Распространение клеток PANC-1<sup>PDX1</sup>/ PANC-1<sup>Контроль</sup> внутри инъекцированных эмбрионов. **А.** Эмбрионы с миграциями на 2 день после трансплантации. **Б.** Эмбрионы без миграций на 2 день после трансплантации. Представлены флуоресцентные (слева) и яркие/флуоресцентные поля (справа). 20-кратное увеличение. hpt - час после трансплантации, dpt - дни после трансплантации.

**Табл. 6.** 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%.

Клетки	PANC-1 <sup>Контроль</sup>			PANC-1 <sup>PDX1</sup>		
	Без siRNA	siPDX1	siNeg	Без siRNA	siNeg	siPDX1
% эмбрионов с миграцией	50%	30%	23%	12,5%	6%	40%

Как показано в Табл. 6, клетки PANC-1<sup>PDX1</sup>, инъецированные 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 инъецированных клеток PANC-1<sup>PDX1</sup>-siPDX1, была на более высоком уровне (в 40%) по сравнению с миграцией клеток PANC 1<sup>PDX1</sup>-siNeg (в 6%). Это может свидетельствовать о том, что экспрессия гена *PDX1* в клетках рака поджелудочной железы подавляет миграционную способность клеток не только *in vitro*, но и *in vivo*.

Результаты, полученные в нашей работе, позволяют предположить, что PDX1 действительно обладает потенциальной активностью подавления эпителиально-мезенхимального перехода, что полностью соответствует данным Roy et al.[14, 94] о роли PDX1 как супрессора эпителиально-мезенхимального перехода на поздних стадиях развития протоковой аденокарциномы ПЖ. Эта активность снижает подвижность клеток из-за способности PDX1 ингибировать приобретение клетками мезенхимоподобного фенотипа.

Этот вывод основан на трех группах наблюдений.

1. Подвижность клеток PANC-1<sup>PDX1</sup> в миграционных тестах «раневого поверхности» монослойных культур заживления ран была замедлена по сравнению с контрольными клетками PANC-1<sup>Контроль</sup>.

2. Результаты анализа направленной миграции клеток через Transwell-систему показали, что количество мигрировавших клеток, экспрессировавших PDX1, также было меньше, чем у контрольных клеток.

3. Результаты анализа способности клеток к миграции *in vivo* также демонстрируют статистически значимое снижение скорости миграции клеток PANC-1<sup>PDX1</sup> по сравнению с контрольными PANC-1. Этот эффект находится в причинно-следственной связи с экспрессией

PDX1, поскольку подавление этой экспрессии с помощью siРНК вызывает синхронное увеличение подвижности клеток.

Механизм этого ингибирования распространения раковых клеток и его связь с метастазированием еще предстоит определить. Развитие метастазов может коррелировать с более мезенхимальным транскриптомным подтипом [190]. Мы оценили экспрессию основных проэпителиальных и промезенхимальных генов в клеточной линии PANC-1, которая экспрессирует PDX1: было обнаружено заметное снижение экспрессии *ZEB1*. Недавно [191],[192] было показано, что эпителиально-мезенхимальный переход является необязательным для метастазирования, потому что генетическое истощение его активаторов SNAI1 или TWIST1 не влияло на инициацию опухоли, инвазию или метастазирование в мышинной модели протоковой аденокарциномы ПЖ. Позже [193] было подтверждено существование ЭМП-зависимого и независимого метастазирования в независимой модели. При этом в исследовании [194] было продемонстрировано, что в отличие от SNAI1 и TWIST1, истощение фактора *ZEB1* сильно влияло на формирование предраковых поражений, стадию опухолевой прогрессии, инвазию и особенно метастазирование во время развития рака ПЖ.

Исходя из данных [194], мы предполагаем, что в нашем случае выполняется зависимость от *ZEB1* программа эпителиально-мезенхимального перехода. Наблюдаемый пониженный уровень экспрессии *ZEB1* ведет к снижению способности клеток PANC-1 к эпителиально-мезенхимальному переходу, уменьшению «мезенхимальности», подвижности и, возможно, метастатической активности.

Кроме того, содержание маркеров KRT8, MUC1 и CDH1, поддерживающих эпителиальный фенотип клеток, в клетках, экспрессирующих PDX1, увеличивается.

В заключение мы полагаем, что наши данные предоставляют достаточно убедительные доказательства роли PDX1 в качестве супрессора эпителиально-мезенхимального перехода и, следовательно, возможно, ингибитора метастазирования. Дальнейшие эксперименты на более приближенной к человеку модели, такой как мышь, позволят исследовать эту проблему более подробно и оценить возможность использования антиметастатических свойств PDX1 в медицине.

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы проводили исследование экспрессии мастер генов развития ПЖ в хирургических образцах рака ПЖ и фетальном материале и показали отсутствие рекапитуляции при раке ПЖ. Это совпало с появившимися литературными данными, что протоковая аденокарцинома ПЖ может представлять многочисленные болезни с одинаковым внешним видом.

Впервые была показана корреляция между значениями экспрессии пар генов *PDX1* и *SOX9*, *PDX1* и *GATA4* в опухолевых образцах.

Мы обратили также 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.

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 без экспрессии *PDX1*.

Результаты, полученные в нашей работе, показывают, что *PDX1* действительно может блокировать способность раковых клеток к распространению. Этот вывод основан на следующих наблюдениях: 1. Скорость «зарастания» 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<sup>*PDX1*</sup> 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<sup>*PDX1*</sup> по сравнению с контрольными клетками PANC-1 в экспериментах на модельных животных, подтвержденное тем фактом, что siRNA ингибирование *PDX1* в клетках PANC-1<sup>*PDX1*</sup> вызывает увеличение подвижности клеток.

Эти результаты могут свидетельствовать о том, что экспрессия гена *PDX1* подавляет метастазирование раковых клеток, и из исследованных нами мастер генов именно *PDX1* имеет

потенциал в качестве ингибитора наиболее опасного и сложного с точки зрения лечения рака ПЖ процесса – метастазирования.

## 6. 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 TGF $\beta$ 1.

3. В процессе эпителиально-мезенхимального перехода, индуцированного воздействием TGF $\beta$ 1, 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.

## 7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AMY – Amylase, Амилаза

ATCC – American Type Culture Collection, Американская Коллекция Типовых Культур

Bhlh – Basic Helix-Loop-Helix, Основной Белок Типа Спираль-Петля-Спираль

CDH1 – E-Кадгерин

CDKN - Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor, Ингибитор Циклин-Зависимой Киназы

CELA – Chymotrypsin Like Elastase, Химотрипсин-Подобная Эластаза

CRA – Carboxypeptidase, Карбоксипептидаза

Dll – Delta-Like, Дельта-Подобный Лиганд

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium, Модифицированная По Методу Дульбекко Среда

Dpc - Day Post Coitum, День После Оплодотворения

Dpt – Day Post Transplantation, Дни После Трансплантации.

EEF – Elongation Factor, Фактор Элонгации

EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor, Рецептор Эпидермального Фактора Роста

FGFR - Fibroblast Growth Factor Receptor, Рецептор К Фактору Роста Фибробластов

Flk – Fetal Liver Kinase, Киназа Печени Плода

FOS - Fos Proto-Oncogene, Протоонкоген Fos

FOXA – Forkhead Box Protein, Транскрипционный Фактор Типа Forkhead

GAPDH - Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, Глицеральдегид-3-Фосфатдегидрогеназа

GATA – GATA Binding Protein, GATA-Связывающий Белок

GFP – Green Fluorescent Protein, Зеленый Флуоресцентный Белок

GSC - Goosecoid Homeobox, Гусиный Гомеобоксный Фактор

HES - Hairy And Enhancer Of Split, Белки Семейства HES

HIF - Hypoxia Inducible Factor, Гипоксия-Индуцированный Фактор

HNF – Hepatocyte Nuclear Factor, Гепатоцитарный Ядерный Фактор

HOX – Гомеобокс

HPRT – Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase, Гипоксантин Фосфорибозилтрансфераза

Hpt – Hour Post Transplantation, Час После Трансплантации

ICAT – Inhibitor Of B-Catenin And Tcf4, Ингибитор B-Катенина И Tcf4

Ipmns – Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms, Внутрипротоковые Папиллярные Муцинозные Новообразования

JUN - Jun Proto-Oncogene, Протоонкоген Jun

KLF – Kruppel Like Factor, Фактор Семейства Kruppel

KRAS – Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog, Гомолог Вирусного Онкогена Саркомы Крысы Кирстен  
 KRT – Цитокератин  
 MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase, Митоген Активированная Протеинкиназа  
 MNX - Motor Neuron And Pancreas Homeobox, Гомеобоксный Фактор Моторных Нейронов И Поджелудочной Железы  
 MODY – Maturity Onset Diabetes Of The Young, Сахарный Диабет Взрослого Типа У Молодых (Диабет Типа Mason)  
 MUC – Муцин  
 NF-Kb – Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B Cells, Ядерный Фактор-Энхансер К-Легких Цепей Активированных В-Клеток  
 NKX - NK Homeobox Protein, Гомеобоксный Белок Типа NK  
 NR – Nuclear Receptor, Ядерный Рецептор  
 ONECUT - ONECUT Transcription Factor, Транскрипционный Фактор Типа ONECUT  
 Panin – Pancreatic Intraepithelial Neoplasia, Панкреатической Интраэпителиальной Неоплазии  
 PBX - Pre-B-Cell Leukemia Transcription Factor, Фактор Транскрипции Пре-В-Клеточного Лейкоза  
 PCNA - Proliferating Cell Nuclear Antigen, Ядерный Антиген Пролиферирующих Клеток  
 PDX – Pancreatic And Duodenal Homeobox, Панкреато- Дуоденальный Гомеобокс  
 PRRX – Paired Related Homeobox, Парный Связанный Гомеобоксный Фактор  
 PTF – Pancreas Associated Transcription Factor, Ассоциированный С Поджелудочной Железой Транскрипционный Фактор  
 PVDF – Polyvinylidene fluoride, Фторид Поливинилидена  
 Rbpjk – Recombination Signal-Binding Protein Jk, Белок, Связывающий Сигнал Рекомбинации  
 SEM – Standart Error Of Mean, Стандартная Ошибка Среднего  
 Sirna – Short Interfered RNA, Малые Интерферирующие РНК  
 SMAD – SMA/MAD-Related Protein, SMA/MAD-Родственный Белок  
 SNAI - Snail Family Transcriptional Repressor, Транскрипционный Репрессор Семейства SNAI  
 SOX – SRY-Box Transcription Factor, Транскрипционный Фактор SRY-Бокса  
 SRY - Sex-Determining Region Y, Область Определения Пола Y  
 STAT - Signal Transducer And Activator Of Transcription, Сигнальный Белок И Активатор Транскрипции  
 TGF-B – Tumor Growth Factor Beta, Фактор Роста Опухолей Бета  
 TWIST - Twist-Like «Helix-Loop-Helix» Transcription Factor, Twist-Подобный Транскрипционный Фактор Типа «Спираль-Петля-Спираль»

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor, Фактор Роста Эндотелия Сосудов

VIM – Виментин

ZEB - Zinc Finger E-Box-Binding Homeobox, Гомеобоксный Белок С Доменом «Цинковые Пальцы», Связывающийся С E-Боксом

АТФ – Аденозинтрифосфорная Кислота

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая Кислота

МЭП – Мезенхимально-Эпителиальный Переход

ПАПЖ – Протоковая Аденокарцинома Поджелудочной Железы

ПЖ – Поджелудочная Железа

ПСА – Персульфат Аммония

ПЦР – Полимеразная Цепная Реакция

РНК – Рибонуклеиновая Кислота

РПЖ – Рак Поджелудочной Железы

ТЕМЕД – Тетраметилэтилендиамин

ЭДТА - Этилендиаминтетраацетат Натрия

ЭМП – Эпителиально-Мезенхимальный Переход

## 8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). / Под ред. А.Д. Каприна В. В. С., Г.В. Петровой М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. – 250 с. с.
2. Hidalgo M. Pancreatic cancer // *N Engl J Med.* – 2010. – Т. 362, № 17. – С. 1605-17.
3. Oberstein P. E., Olive K. P. Pancreatic cancer: why is it so hard to treat? // *Therap Adv Gastroenterol.* – 2013. – Т. 6, № 4. – С. 321-37.
4. McGuire S. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015 // *Adv Nutr.* – 2016. – Т. 7, № 2. – С. 418-9.
5. Rawla P., Thandra K. C., Sunkara T. Pancreatic cancer and obesity: epidemiology, mechanism, and preventive strategies // *Clin J Gastroenterol.* – 2019. – Т. 12, № 4. – С. 285-291.
6. Wolfgang C. L., Herman J. M., Laheru D. A., Klein A. P., Erdek M. A., Fishman E. K., Hruban R. H. Recent progress in pancreatic cancer // *CA Cancer J Clin.* – 2013. – Т. 63, № 5. – С. 318-48.
7. Garraway L. A., Sellers W. R. Lineage dependency and lineage-survival oncogenes in human cancer // *Nat Rev Cancer.* – 2006. – Т. 6, № 8. – С. 593-602.
8. Kopantzev E. P., Monastyrskaya G. S., Vinogradova T. V., Zinovyeva M. V., Kostina M. B., Filyukova O. B., Tonevitsky A. G., Sukhikh G. T., Sverdlov E. D. Differences in gene expression levels between early and later stages of human lung development are opposite to those between normal lung tissue and non-small lung cell carcinoma // *Lung Cancer.* – 2008. – Т. 62, № 1. – С. 23-34.
9. Drilon A., Rekhtman N., Ladanyi M., Paik P. Squamous-cell carcinomas of the lung: emerging biology, controversies, and the promise of targeted therapy // *Lancet Oncol.* – 2012. – Т. 13, № 10. – С. e418-26.
10. Oestreich K. J., Weinmann A. S. Master regulators or lineage-specifying? Changing views on CD4+ T cell transcription factors // *Nat Rev Immunol.* – 2012. – Т. 12, № 11. – С. 799-804.
11. Chan S. S., Kyba M. What is a Master Regulator? // *J Stem Cell Res Ther.* – 2013. – Т. 3.
12. Cano D. A., Soria B., Martin F., Rojas A. Transcriptional control of mammalian pancreas organogenesis // *Cell Mol Life Sci.* – 2014. – Т. 71, № 13. – С. 2383-402.
13. Varmus H. The new era in cancer research // *Science.* – 2006. – Т. 312, № 5777. – С. 1162-5.

14. Willett C. G., Czito B. G., Bendell J. C., Ryan D. P. Locally advanced pancreatic cancer // *J Clin Oncol.* – 2005. – Т. 23, № 20. – С. 4538-44.
15. Idachaba S., Dada O., Abimbola O., Olayinka O., Uma A., Olunu E., Fakoya A. O. J. A Review of Pancreatic Cancer: Epidemiology, Genetics, Screening, and Management // *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences.* – 2019. – Т. 7, № 4. – С. 663-671.
16. Виноградова Т.В. С. Е. Д. PDX1: уникальный панкреатический мастер регулятор многократно меняет функции в процессе эмбрионального развития и прогрессии рака поджелудочной железы // *Биохимия.* – 2017. – Т. 82, № 8. – С. 1154-1162.
17. Ischenko I., Petrenko O., Hayman M. J. Analysis of the tumor-initiating and metastatic capacity of PDX1-positive cells from the adult pancreas // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2014. – Т. 111, № 9. – С. 3466-71.
18. McGuigan A., Kelly P., Turkington R. C., Jones C., Coleman H. G., McCain R. S. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes // *World Journal of Gastroenterology.* – 2018. – Т. 24, № 43. – С. 4846-4861.
19. Hanahan D., Weinberg R. A. The hallmarks of cancer // *Cell.* – 2000. – Т. 100, № 1. – С. 57-70.
20. Hanahan D., Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: the next generation // *Cell.* – 2011. – Т. 144, № 5. – С. 646-74.
21. Liu J. The dualistic origin of human tumors // *Semin Cancer Biol.* – 2018. – Т. 53. – С. 1-16.
22. Hanselmann R. G., Welter C. Origin of Cancer: An Information, Energy, and Matter Disease // *Front Cell Dev Biol.* – 2016. – Т. 4. – С. 121.
23. Mack S. C., Witt H., Piro R. M., Gu L., Zuyderduyn S., Stutz A. M., Wang X., Gallo M., Garzia L., Zayne K., Zhang X., Ramaswamy V., Jager N., Jones D. T., Sill M., Pugh T. J., Ryzhova M., Wani K. M., Shih D. J., Head R., Remke M., Bailey S. D., Zichner T., Faria C. C., Barszczyk M., Stark S., Seker-Cin H., Hutter S., Johann P., Bender S., Hovestadt V., Tzaridis T., Dubuc A. M., Northcott P. A., Peacock J., Bertrand K. C., Agnihotri S., Cavalli F. M., Clarke I., Nethery-Brookx K., Creasy C. L., Verma S. K., Koster J., Wu X., Yao Y., Milde T., Sin-Chan P., Zuccaro J., Lau L., Pereira S., Castelo-Branco P., Hirst M., Marra M. A., Roberts S. S., Fults D., Massimi L., Cho Y. J., Van Meter T., Grajkowska W., Lach B., Kulozik A. E., von Deimling A., Witt O., Scherer S. W., Fan X., Muraszko K. M., Kool M., Pomeroy S. L., Gupta N., Phillips J., Huang A., Tabori U., Hawkins C., Malkin D., Kongkham P. N., Weiss W. A., Jabado N., Rutka J. T., Bouffet E., Korbel J. O., Lupien M., Aldape K.

- D., Bader G. D., Eils R., Lichter P., Dirks P. B., Pfister S. M., Korshunov A., Taylor M. D. Epigenomic alterations define lethal CIMP-positive ependymomas of infancy // *Nature*. – 2014. – T. 506, № 7489. – C. 445-50.
24. Martincorena I., Roshan A., Gerstung M., Ellis P., Van Loo P., McLaren S., Wedge D. C., Fullam A., Alexandrov L. B., Tubio J. M., Stebbings L., Menzies A., Widaa S., Stratton M. R., Jones P. H., Campbell P. J. Tumor evolution. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin // *Science*. – 2015. – T. 348, № 6237. – C. 880-6.
25. Cofre J., Abdelhay E. Cancer Is to Embryology as Mutation Is to Genetics: Hypothesis of the Cancer as Embryological Phenomenon // *The Scientific World Journal*. – 2017. – T. 2017. – C. 1-17.
26. Chambers A. F., Groom A. C., MacDonald I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites // *Nat Rev Cancer*. – 2002. – T. 2, № 8. – C. 563-72.
27. Kalluri R., Weinberg R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition // *Journal of Clinical Investigation*. – 2009. – T. 119, № 6. – C. 1420-1428.
28. Aiello N. M., Maddipati R., Norgard R. J., Balli D., Li J., Yuan S., Yamazoe T., Black T., Sahmoud A., Furth E. E., Bar-Sagi D., Stanger B. Z. EMT Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration // *Dev Cell*. – 2018. – T. 45, № 6. – C. 681-695 e4.
29. Roche J. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer // *Cancers (Basel)*. – 2018. – T. 10, № 2.
30. Thiery J. P., Sleeman J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2006. – T. 7, № 2. – C. 131-42.
31. Huang R. Y., Guilford P., Thiery J. P. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition // *J Cell Sci*. – 2012. – T. 125, № Pt 19. – C. 4417-22.
32. Peinado H., Olmeda D., Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? // *Nat Rev Cancer*. – 2007. – T. 7, № 6. – C. 415-28.
33. De Craene B., Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression // *Nat Rev Cancer*. – 2013. – T. 13, № 2. – C. 97-110.
34. Papaccio F., Paino F., Regad T., Papaccio G., Desiderio V., Tirino V. Concise Review: Cancer Cells, Cancer Stem Cells, and Mesenchymal Stem Cells: Influence in Cancer Development // *Stem Cells Transl Med*. – 2017. – T. 6, № 12. – C. 2115-2125.

35. Nimmakayala R. K., Batra S. K., Ponnusamy M. P. Unraveling the journey of cancer stem cells from origin to metastasis // *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. – 2019. – Т. 1871, № 1. – С. 50-63.
36. Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F., Weissman I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells // *Nature*. – 2001. – Т. 414, № 6859. – С. 105-11.
37. White A. C., Lowry W. E. Refining the role for adult stem cells as cancer cells of origin // *Trends in Cell Biology*. – 2015. – Т. 25, № 1. – С. 11-20.
38. Свердлов Е.Д. П. В. В., Алексеенко И.В., Виноградова Татьяна Викторовна, Копанцев Е.П., Дидыч Д.А. Взрослые стволовые клетки и другие резиденты рака. Часть 1 // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. – 2015. – Т. 33, № 3. – С. 3-8.
39. Blanpain C. Tracing the cellular origin of cancer // *Nat Cell Biol*. – 2013. – Т. 15, № 2. – С. 126-34.
40. Smith B. A., Balanis N. G., Nanjundiah A., Sheu K. M., Tsai B. L., Zhang Q., Park J. W., Thompson M., Huang J., Witte O. N., Graeber T. G. A Human Adult Stem Cell Signature Marks Aggressive Variants across Epithelial Cancers // *Cell Rep*. – 2018. – Т. 24, № 12. – С. 3353-3366 e5.
41. Blokzijl F., de Ligt J., Jager M., Sasselli V., Roerink S., Sasaki N., Huch M., Boymans S., Kuijk E., Prins P., Nijman I. J., Martincorena I., Mokry M., Wiegerinck C. L., Middendorp S., Sato T., Schwank G., Nieuwenhuis E. E., Verstegen M. M., van der Laan L. J., de Jonge J., JN I. J., Vries R. G., van de Wetering M., Stratton M. R., Clevers H., Cuppen E., van Boxtel R. Tissue-specific mutation accumulation in human adult stem cells during life // *Nature*. – 2016. – Т. 538, № 7624. – С. 260-264.
42. Liberti M. V., Locasale J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? // *Trends Biochem Sci*. – 2016. – Т. 41, № 3. – С. 211-218.
43. Wang P., Lan C., Xiong S., Zhao X., Shan Y., Hu R., Wan W., Yu S., Liao B., Li G., Wang J., Zou D., Chen B., Feng H., Wu N. HIF1alpha regulates single differentiated glioma cell dedifferentiation to stem-like cell phenotypes with high tumorigenic potential under hypoxia // *Oncotarget*. – 2017. – Т. 8, № 17. – С. 28074-28092.
44. Ziv O., Glaser B., Dor Y. The plastic pancreas // *Dev Cell*. – 2013. – Т. 26, № 1. – С. 3-7.
45. Pan F. C., Bankaitis E. D., Boyer D., Xu X., Van de Castele M., Magnuson M. A., Heimberg H., Wright C. V. Spatiotemporal patterns of multipotentiality in Ptf1a-expressing cells during pancreas organogenesis and injury-induced facultative restoration // *Development*. – 2013. – Т. 140, № 4. – С. 751-64.

46. Shih H. P., Wang A., Sander M. Pancreas organogenesis: from lineage determination to morphogenesis // *Annu Rev Cell Dev Biol.* – 2013. – T. 29. – C. 81-105.
47. Kopp J. L., von Figura G., Mayes E., Liu F. F., Dubois C. L., Morris J. P. t., Pan F. C., Akiyama H., Wright C. V., Jensen K., Hebrok M., Sander M. Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma // *Cancer Cell.* – 2012. – T. 22, № 6. – C. 737-50.
48. Gonzales K. A. U., Ng H. H. Choreographing pluripotency and cell fate with transcription factors // *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms.* – 2011. – T. 1809, № 7. – C. 337-349.
49. Sarkar A., Hochedlinger K. The Sox Family of Transcription Factors: Versatile Regulators of Stem and Progenitor Cell Fate // *Cell Stem Cell.* – 2013. – T. 12, № 1. – C. 15-30.
50. Novak D., Huser L., Elton J. J., Umansky V., Altevogt P., Utikal J. SOX2 in development and cancer biology // *Semin Cancer Biol.* – 2019.10.1016/j.semcancer.2019.08.007.
51. Vanner R. J., Remke M., Gallo M., Selvadurai H. J., Coutinho F., Lee L., Kushida M., Head R., Morrissy S., Zhu X., Aviv T., Voisin V., Clarke I. D., Li Y., Mungall A. J., Moore R. A., Ma Y., Jones S. J., Marra M. A., Malkin D., Northcott P. A., Kool M., Pfister S. M., Bader G., Hochedlinger K., Korshunov A., Taylor M. D., Dirks P. B. Quiescent sox2(+) cells drive hierarchical growth and relapse in sonic hedgehog subgroup medulloblastoma // *Cancer Cell.* – 2014. – T. 26, № 1. – C. 33-47.
52. Boumahdi S., Driessens G., Lapouge G., Rorive S., Nassar D., Le Mercier M., Delatte B., Caauwe A., Lenglez S., Nkusi E., Brohee S., Salmon I., Dubois C., del Marmol V., Fuks F., Beck B., Blanpain C. SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma // *Nature.* – 2014. – T. 511, № 7508. – C. 246-50.
53. Mamun M. A., Mannoor K., Cao J., Qadri F., Song X. SOX2 in Cancer Stemness: Tumor Malignancy and Therapeutic Potentials // *J Mol Cell Biol.* – 2018.10.1093/jmcb/mjy080.
54. Xiang R., Liao D., Cheng T., Zhou H., Shi Q., Chuang T. S., Markowitz D., Reisfeld R. A., Luo Y. Downregulation of transcription factor SOX2 in cancer stem cells suppresses growth and metastasis of lung cancer // *Br J Cancer.* – 2011. – T. 104, № 9. – C. 1410-7.
55. Gangemi R. M., Griffiero F., Marubbi D., Perera M., Capra M. C., Malatesta P., Ravetti G. L., Zona G. L., Daga A., Corte G. SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity // *Stem Cells.* – 2009. – T. 27, № 1. – C. 40-8.

56. Smith J., Zyoud A., Allegrucci C. A Case of Identity: HOX Genes in Normal and Cancer Stem Cells // *Cancers (Basel)*. – 2019. – T. 11, № 4.
57. Morgan R., El-Tanani M., Hunter K. D., Harrington K. J., Pandha H. S. Targeting HOX/PBX dimers in cancer // *Oncotarget*. – 2017. – T. 8, № 19. – C. 32322-32331.
58. Morgan R., El-Tanani M. HOX Genes as Potential Markers of Circulating Tumour Cells // *Curr Mol Med*. – 2016. – T. 16, № 4. – C. 322-7.
59. Shah M., Cardenas R., Wang B., Persson J., Mongan N. P., Grabowska A., Allegrucci C. HOXC8 regulates self-renewal, differentiation and transformation of breast cancer stem cells // *Mol Cancer*. – 2017. – T. 16, № 1. – C. 38.
60. Bastidas-Ponce A., Scheibner K., Lickert H., Bakhti M. Cellular and molecular mechanisms coordinating pancreas development // *Development*. – 2017. – T. 144, № 16. – C. 2873-2888.
61. Mastracci T. L., Sussel L. The endocrine pancreas: insights into development, differentiation, and diabetes // *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. – 2012. – T. 1, № 5. – C. 609-28.
62. Bardeesy N., DePinho R. A. Pancreatic cancer biology and genetics // *Nat Rev Cancer*. – 2002. – T. 2, № 12. – C. 897-909.
63. Slack J. M. Developmental biology of the pancreas // *Development*. – 1995. – T. 121, № 6. – C. 1569-80.
64. Suckale J., Solimena M. Pancreas islets in metabolic signaling--focus on the beta-cell // *Front Biosci*. – 2008. – T. 13. – C. 7156-71.
65. Landsman L., Nijagal A., Whitchurch T. J., Vanderlaan R. L., Zimmer W. E., Mackenzie T. C., Hebrok M. Pancreatic mesenchyme regulates epithelial organogenesis throughout development // *PLoS Biol*. – 2011. – T. 9, № 9. – C. e1001143.
66. Suda K., Matsumoto Y., Fujii H., Sekikawa T., Yamamoto M., Eguchi H. Multiple 'cysts' in the entire pancreas in a case of cystic adenocarcinoma of the pancreas // *J Gastroenterol Hepatol*. – 1993. – T. 8, № 3. – C. 304-8.
67. Sapir T., Shternhall K., Meivar-Levy I., Blumenfeld T., Cohen H., Skutelsky E., Eventov-Friedman S., Barshack I., Goldberg I., Pri-Chen S., Ben-Dor L., Polak-Charcon S., Karasik A., Shimon I., Mor E., Ferber S. Cell-replacement therapy for diabetes: Generating functional insulin-producing tissue from adult human liver cells // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2005. – T. 102, № 22. – C. 7964-9.

68. Basson M. A. Signaling in cell differentiation and morphogenesis // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2012. – T. 4, № 6.
69. Xu F., Li X., Wu L., Zhang Q., Yang R., Yang Y., Zhang Z., He Q., Chang C. Overexpression of the EZH2, RING1 and BMI1 genes is common in myelodysplastic syndromes: relation to adverse epigenetic alteration and poor prognostic scoring // *Ann Hematol.* – 2011. – T. 90, № 6. – C. 643-53.
70. Afelik S., Chen Y., Pieler T. Combined ectopic expression of Pdx1 and Ptf1a/p48 results in the stable conversion of posterior endoderm into endocrine and exocrine pancreatic tissue // *Genes Dev.* – 2006. – T. 20, № 11. – C. 1441-6.
71. Wiebe P. O., Kormish J. D., Roper V. T., Fujitani Y., Alston N. I., Zaret K. S., Wright C. V., Stein R. W., Gannon M. Ptf1a binds to and activates area III, a highly conserved region of the Pdx1 promoter that mediates early pancreas-wide Pdx1 expression // *Mol Cell Biol.* – 2007. – T. 27, № 11. – C. 4093-104.
72. Masui T., Swift G. H., Hale M. A., Meredith D. M., Johnson J. E., Macdonald R. J. Transcriptional autoregulation controls pancreatic Ptf1a expression during development and adulthood // *Mol Cell Biol.* – 2008. – T. 28, № 17. – C. 5458-68.
73. Sellick G. S., Barker K. T., Stolte-Dijkstra I., Fleischmann C., Coleman R. J., Garrett C., Gloyn A. L., Edghill E. L., Hattersley A. T., Wellauer P. K., Goodwin G., Houlston R. S. Mutations in PTF1A cause pancreatic and cerebellar agenesis // *Nat Genet.* – 2004. – T. 36, № 12. – C. 1301-5.
74. Haumaitre C., Fabre M., Cormier S., Baumann C., Delezoide A. L., Cereghini S. Severe pancreas hypoplasia and multicystic renal dysplasia in two human fetuses carrying novel HNF1beta/MODY5 mutations // *Hum Mol Genet.* – 2006. – T. 15, № 15. – C. 2363-75.
75. Xuan S., Borok M. J., Decker K. J., Battle M. A., Duncan S. A., Hale M. A., Macdonald R. J., Sussel L. Pancreas-specific deletion of mouse Gata4 and Gata6 causes pancreatic agenesis // *J Clin Invest.* – 2012. – T. 122, № 10. – C. 3516-28.
76. Arda H. E., Benitez C. M., Kim S. K. Gene regulatory networks governing pancreas development // *Dev Cell.* – 2013. – T. 25, № 1. – C. 5-13.
77. Seymour P. A. Sox9: a master regulator of the pancreatic program // *Rev Diabet Stud.* – 2014. – T. 11, № 1. – C. 51-83.

78. Schaffer A. E., Freude K. K., Nelson S. B., Sander M. Nkx6 transcription factors and Ptf1a function as antagonistic lineage determinants in multipotent pancreatic progenitors // *Dev Cell*. – 2010. – T. 18, № 6. – C. 1022-9.
79. Beres T. M., Masui T., Swift G. H., Shi L., Henke R. M., MacDonald R. J. PTF1 is an organ-specific and Notch-independent basic helix-loop-helix complex containing the mammalian Suppressor of Hairless (RBP-J) or its paralogue, RBP-L // *Mol Cell Biol*. – 2006. – T. 26, № 1. – C. 117-30.
80. Wang S., Yan J., Anderson D. A., Xu Y., Kanal M. C., Cao Z., Wright C. V., Gu G. Neurog3 gene dosage regulates allocation of endocrine and exocrine cell fates in the developing mouse pancreas // *Dev Biol*. – 2010. – T. 339, № 1. – C. 26-37.
81. Magenheim J., Ilovich O., Lazarus A., Klochendler A., Ziv O., Werman R., Hija A., Cleaver O., Mishani E., Keshet E., Dor Y. Blood vessels restrain pancreas branching, differentiation and growth // *Development*. – 2011. – T. 138, № 21. – C. 4743-52.
82. Ejarque M., Cervantes S., Pujadas G., Tutusaus A., Sanchez L., Gasa R. Neurogenin3 cooperates with Foxa2 to autoactivate its own expression // *J Biol Chem*. – 2013. – T. 288, № 17. – C. 11705-17.
83. Miyatsuka T., Kosaka Y., Kim H., German M. S. Neurogenin3 inhibits proliferation in endocrine progenitors by inducing Cdkn1a // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2011. – T. 108, № 1. – C. 185-90.
84. Roy N., Hebrok M. Regulation of Cellular Identity in Cancer // *Dev Cell*. – 2015. – T. 35, № 6. – C. 674-84.
85. Wang A., Yue F., Li Y., Xie R., Harper T., Patel N. A., Muth K., Palmer J., Qiu Y., Wang J., Lam D. K., Raum J. C., Stoffers D. A., Ren B., Sander M. Epigenetic priming of enhancers predicts developmental competence of hESC-derived endodermal lineage intermediates // *Cell Stem Cell*. – 2015. – T. 16, № 4. – C. 386-99.
86. Fujimoto K., Polonsky K. S. Pdx1 and other factors that regulate pancreatic beta-cell survival // *Diabetes Obes Metab*. – 2009. – T. 11 Suppl 4. – C. 30-7.
87. Bernardo A. S., Hay C. W., Docherty K. Pancreatic transcription factors and their role in the birth, life and survival of the pancreatic beta cell // *Mol Cell Endocrinol*. – 2008. – T. 294, № 1-2. – C. 1-9.
88. Park J. Y., Hong S. M., Klimstra D. S., Goggins M. G., Maitra A., Hruban R. H. Pdx1 expression in pancreatic precursor lesions and neoplasms // *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. – 2011. – T. 19, № 5. – C. 444-9.

89. Fendrich V., Esni F., Garay M. V., Feldmann G., Habbe N., Jensen J. N., Dor Y., Stoffers D., Jensen J., Leach S. D., Maitra A. Hedgehog signaling is required for effective regeneration of exocrine pancreas // *Gastroenterology*. – 2008. – T. 135, № 2. – C. 621-31.
90. Taguchi M., Yamaguchi T., Otsuki M. Induction of PDX-1-positive cells in the main duct during regeneration after acute necrotizing pancreatitis in rats // *J Pathol*. – 2002. – T. 197, № 5. – C. 638-46.
91. Wang X. P., Li Z. J., Magnusson J., Brunnicardi F. C. Tissue MicroArray analyses of pancreatic duodenal homeobox-1 in human cancers // *World J Surg*. – 2005. – T. 29, № 3. – C. 334-8.
92. Liu S. H., Rao D. D., Nemunaitis J., Senzer N., Zhou G., Dawson D., Gingras M. C., Wang Z., Gibbs R., Norman M., Templeton N. S., Demayo F. J., O'Malley B., Sanchez R., Fisher W. E., Brunnicardi F. C. PDX-1 is a therapeutic target for pancreatic cancer, insulinoma and islet neoplasia using a novel RNA interference platform // *PLoS One*. – 2012. – T. 7, № 8. – C. e40452.
93. Liu S., Ballian N., Belaguli N. S., Patel S., Li M., Templeton N. S., Gingras M. C., Gibbs R., Fisher W., Brunnicardi F. C. PDX-1 acts as a potential molecular target for treatment of human pancreatic cancer // *Pancreas*. – 2008. – T. 37, № 2. – C. 210-20.
94. Roy N., Takeuchi K. K., Ruggeri J. M., Bailey P., Chang D., Li J., Leonhardt L., Puri S., Hoffman M. T., Gao S., Halbrook C. J., Song Y., Ljungman M., Malik S., Wright C. V., Dawson D. W., Biankin A. V., Hebrok M., Crawford H. C. PDX1 dynamically regulates pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and maintenance // *Genes Dev*. – 2016. – T. 30, № 24. – C. 2669-2683.
95. Chaudhary J., Skinner M. K. Basic helix-loop-helix proteins can act at the E-box within the serum response element of the c-fos promoter to influence hormone-induced promoter activation in Sertoli cells // *Mol Endocrinol*. – 1999. – T. 13, № 5. – C. 774-86.
96. Thompson N., Gesina E., Scheinert P., Bucher P., Grapin-Botton A. RNA profiling and chromatin immunoprecipitation-sequencing reveal that PTF1a stabilizes pancreas progenitor identity via the control of MNX1/HLXB9 and a network of other transcription factors // *Mol Cell Biol*. – 2012. – T. 32, № 6. – C. 1189-99.
97. Dalgin G., Ward A. B., Hao le T., Beattie C. E., Nechiporuk A., Prince V. E. Zebrafish *mnx1* controls cell fate choice in the developing endocrine pancreas // *Development*. – 2011. – T. 138, № 21. – C. 4597-608.

98. Yamamoto K., Matsuoka T. A., Kawashima S., Takebe S., Kubo F., Miyatsuka T., Kaneto H., Shimomura I. A novel function of Onecut1 protein as a negative regulator of MafA gene expression // *J Biol Chem.* – 2013. – Т. 288, № 30. – С. 21648-58.
99. Ahnfelt-Ronne J., Jorgensen M. C., Klinck R., Jensen J. N., Fuchtbauer E. M., Deering T., MacDonald R. J., Wright C. V., Madsen O. D., Serup P. Ptf1a-mediated control of Dll1 reveals an alternative to the lateral inhibition mechanism // *Development.* – 2012. – Т. 139, № 1. – С. 33-45.
100. Wells J. M., Esni F., Boivin G. P., Aronow B. J., Stuart W., Combs C., Sklenka A., Leach S. D., Lowy A. M. Wnt/beta-catenin signaling is required for development of the exocrine pancreas // *BMC Dev Biol.* – 2007. – Т. 7. – С. 4.
101. Yoshitomi H., Zaret K. S. Endothelial cell interactions initiate dorsal pancreas development by selectively inducing the transcription factor Ptf1a // *Development.* – 2004. – Т. 131, № 4. – С. 807-17.
102. Dufresne M., Clerc P., Dieng M., Edir A., Couvelard A., Delisle M. B., Fourmy D., Gigoux V. Id3 modulates cellular localization of bHLH Ptf1-p48 protein // *Int J Cancer.* – 2011. – Т. 129, № 2. – С. 295-306.
103. Campos M. L., Sanchez-Arevalo Lobo V. J., Rodolosse A., Gottardi C. J., Mafficini A., Beghelli S., Scardoni M., Bassi C., Scarpa A., Real F. X. ICAT is a novel Ptf1a interactor that regulates pancreatic acinar differentiation and displays altered expression in tumours // *Biochem J.* – 2013. – Т. 451, № 3. – С. 395-405.
104. Буланенкова С. С., Снежков Е. В., Акопов С. Б. SOX9 как одно из центральных звеньев оси регуляции эмбрионального развития и прогрессии рака поджелудочной железы // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* – 2019. – Т. 37, № 3. – С. 113-121.
105. Seymour P. A., Freude K. K., Tran M. N., Mayes E. E., Jensen J., Kist R., Scherer G., Sander M. SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2007. – Т. 104, № 6. – С. 1865-70.
106. Lynn F. C., Smith S. B., Wilson M. E., Yang K. Y., Nekrep N., German M. S. Sox9 coordinates a transcriptional network in pancreatic progenitor cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2007. – Т. 104, № 25. – С. 10500-5.
107. Belo J., Krishnamurthy M., Oakie A., Wang R. The role of SOX9 transcription factor in pancreatic and duodenal development // *Stem Cells Dev.* – 2013. – Т. 22, № 22. – С. 2935-43.

108. Furuyama K., Kawaguchi Y., Akiyama H., Horiguchi M., Kodama S., Kuhara T., Hosokawa S., Elbahrawy A., Soeda T., Koizumi M., Masui T., Kawaguchi M., Takaori K., Doi R., Nishi E., Kakinoki R., Deng J. M., Behringer R. R., Nakamura T., Uemoto S. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine // *Nat Genet.* – 2011. – T. 43, № 1. – C. 34-41.
109. Mead T. J., Wang Q., Bhattaram P., Dy P., Afelik S., Jensen J., Lefebvre V. A far-upstream (-70 kb) enhancer mediates Sox9 auto-regulation in somatic tissues during development and adult regeneration // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – T. 41, № 8. – C. 4459-69.
110. Jeannot P., Callot C., Baer R., Duquesnes N., Guerra C., Guillermet-Guibert J., Bachs O., Besson A. Loss of p27Kip(1) promotes metaplasia in the pancreas via the regulation of Sox9 expression // *Oncotarget.* – 2015. – T. 6, № 34. – C. 35880-92.
111. Prevot P. P., Simion A., Grimont A., Colletti M., Khalaileh A., Van den Steen G., Sempoux C., Xu X., Roelants V., Hald J., Bertrand L., Heimberg H., Konieczny S. F., Dor Y., Lemaigre F. P., Jacquemin P. Role of the ductal transcription factors HNF6 and Sox9 in pancreatic acinar-to-ductal metaplasia // *Gut.* – 2012. – T. 61, № 12. – C. 1723-32.
112. Lentjes M. H., Niessen H. E., Akiyama Y., de Bruine A. P., Melotte V., van Engeland M. The emerging role of GATA transcription factors in development and disease // *Expert Rev Mol Med.* – 2016. – T. 18. – C. e3.
113. Carrasco M., Delgado I., Soria B., Martin F., Rojas A. GATA4 and GATA6 control mouse pancreas organogenesis // *J Clin Invest.* – 2012. – T. 122, № 10. – C. 3504-15.
114. Shaw-Smith C., De Franco E., Lango Allen H., Batlle M., Flanagan S. E., Borowiec M., Taplin C. E., van Alfen-van der Velden J., Cruz-Rojo J., Perez de Nanclares G., Miedzybrodzka Z., Deja G., Wlodarska I., Mlynarski W., Ferrer J., Hattersley A. T., Ellard S. GATA4 mutations are a cause of neonatal and childhood-onset diabetes // *Diabetes.* – 2014. – T. 63, № 8. – C. 2888-94.
115. Fujikura J., Yamato E., Yonemura S., Hosoda K., Masui S., Nakao K., Miyazaki Ji J., Niwa H. Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors // *Genes Dev.* – 2002. – T. 16, № 7. – C. 784-9.
116. Holtzinger A., Evans T. Gata4 regulates the formation of multiple organs // *Development.* – 2005. – T. 132, № 17. – C. 4005-14.

117. Karafin M. S., Cummings C. T., Fu B., Iacobuzio-Donahue C. A. The developmental transcription factor Gata4 is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma // *Int J Clin Exp Pathol.* – 2009. – T. 3, № 1. – C. 47-55.
118. Decker K., Goldman D. C., Grash C. L., Sussel L. Gata6 is an important regulator of mouse pancreas development // *Dev Biol.* – 2006. – T. 298, № 2. – C. 415-29.
119. Gong Y., Zhang L., Zhang A., Chen X., Gao P., Zeng Q. GATA4 inhibits cell differentiation and proliferation in pancreatic cancer // *PLoS One.* – 2018. – T. 13, № 8. – C. e0202449.
120. Fu B., Guo M., Wang S., Campagna D., Luo M., Herman J. G., Iacobuzio-Donahue C. A. Evaluation of GATA-4 and GATA-5 methylation profiles in human pancreatic cancers indicate promoter methylation patterns distinct from other human tumor types // *Cancer Biol Ther.* – 2007. – T. 6, № 10. – C. 1546-52.
121. Yu D. D., Guo S. W., Jing Y. Y., Dong Y. L., Wei L. X. A review on hepatocyte nuclear factor-1beta and tumor // *Cell Biosci.* – 2015. – T. 5. – C. 58.
122. Azmi A. S., Bao G. W., Gao J., Mohammad R. M., Sarkar F. H. Network insights into the genes regulated by hepatocyte nuclear factor 4 in response to drug induced perturbations: a review // *Curr Drug Discov Technol.* – 2013. – T. 10, № 2. – C. 147-54.
123. Gudmundsson J., Sulem P., Steinthorsdottir V., Bergthorsson J. T., Thorleifsson G., Manolescu A., Rafnar T., Gudbjartsson D., Agnarsson B. A., Baker A., Sigurdsson A., Benediktsdottir K. R., Jakobsdottir M., Blondal T., Stacey S. N., Helgason A., Gunnarsdottir S., Olafsdottir A., Kristinsson K. T., Birgisdottir B., Ghosh S., Thorlacius S., Magnusdottir D., Stefansdottir G., Kristjansson K., Bagger Y., Wilensky R. L., Reilly M. P., Morris A. D., Kimber C. H., Adeyemo A., Chen Y., Zhou J., So W. Y., Tong P. C., Ng M. C., Hansen T., Andersen G., Borch-Johnsen K., Jorgensen T., Tres A., Fuertes F., Ruiz-Echarri M., Asin L., Saez B., van Boven E., Klaver S., Swinkels D. W., Aben K. K., Graif T., Cashy J., Suarez B. K., van Vierssen Trip O., Frigge M. L., Ober C., Hofker M. H., Wijmenga C., Christiansen C., Rader D. J., Palmer C. N., Rotimi C., Chan J. C., Pedersen O., Sigurdsson G., Benediktsson R., Jonsson E., Einarsson G. V., Mayordomo J. I., Catalona W. J., Kiemeny L. A., Barkardottir R. B., Gulcher J. R., Thorsteinsdottir U., Kong A., Stefansson K. Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes // *Nat Genet.* – 2007. – T. 39, № 8. – C. 977-83.
124. Horikawa Y., Iwasaki N., Hara M., Furuta H., Hinokio Y., Cockburn B. N., Lindner T., Yamagata K., Ogata M., Tomonaga O., Kuroki H., Kasahara T., Iwamoto Y., Bell G. I. Mutation in hepatocyte

- nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY // *Nat Genet.* – 1997. – T. 17, № 4. – C. 384-5.
125. Poll A. V., Pierreux C. E., Lokmane L., Haumaitre C., Achouri Y., Jacquemin P., Rousseau G. G., Cereghini S., Lemaigre F. P. A vHNF1/TCF2-HNF6 cascade regulates the transcription factor network that controls generation of pancreatic precursor cells // *Diabetes.* – 2006. – T. 55, № 1. – C. 61-9.
126. De Vas M. G., Kopp J. L., Heliot C., Sander M., Cereghini S., Haumaitre C. Hnf1b controls pancreas morphogenesis and the generation of Ngn3<sup>+</sup> endocrine progenitors // *Development.* – 2015. – T. 142, № 5. – C. 871-82.
127. Haumaitre C., Barbacci E., Jenny M., Ott M. O., Gradwohl G., Cereghini S. Lack of TCF2/vHNF1 in mice leads to pancreas agenesis // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2005. – T. 102, № 5. – C. 1490-5.
128. Kopp J. L., Dubois C. L., Schaffer A. E., Hao E., Shih H. P., Seymour P. A., Ma J., Sander M. Sox9<sup>+</sup> ductal cells are multipotent progenitors throughout development but do not produce new endocrine cells in the normal or injured adult pancreas // *Development.* – 2011. – T. 138, № 4. – C. 653-65.
129. Lokmane L., Haumaitre C., Garcia-Villalba P., Anselme I., Schneider-Maunoury S., Cereghini S. Crucial role of vHNF1 in vertebrate hepatic specification // *Development.* – 2008. – T. 135, № 16. – C. 2777-86.
130. Solar M., Cardalda C., Houbracken I., Martin M., Maestro M. A., De Medts N., Xu X., Grau V., Heimberg H., Bouwens L., Ferrer J. Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth // *Dev Cell.* – 2009. – T. 17, № 6. – C. 849-60.
131. Coffinier C., Gresh L., Fiette L., Tronche F., Schutz G., Babinet C., Pontoglio M., Yaniv M., Barra J. Bile system morphogenesis defects and liver dysfunction upon targeted deletion of HNF1beta // *Development.* – 2002. – T. 129, № 8. – C. 1829-38.
132. Edghill E. L., Bingham C., Ellard S., Hattersley A. T. Mutations in hepatocyte nuclear factor-1beta and their related phenotypes // *J Med Genet.* – 2006. – T. 43, № 1. – C. 84-90.
133. Quilichini E., Fabre M., Dirami T., Stedman A., De Vas M., Ozguc O., Pasek R. C., Cereghini S., Morillon L., Guerra C., Couvelard A., Gannon M., Haumaitre C. Pancreatic Ductal Deletion of Hnf1b

- Disrupts Exocrine Homeostasis, Leads to Pancreatitis, and Facilitates Tumorigenesis // *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* – 2019. – T. 8, № 3. – C. 487-511.
134. Kim L., Liao J., Zhang M., Talamonti M., Bentrem D., Rao S., Yang G. Y. Clear cell carcinoma of the pancreas: histopathologic features and a unique biomarker: hepatocyte nuclear factor-1beta // *Mod Pathol.* – 2008. – T. 21, № 9. – C. 1075-83.
135. Yang M. X., Coates R. F., Ambaye A., Gardner J. A., Zubarick R., Gao Y., Skelly J., Liu J. G., Mino-Kenudson M. Investigation of HNF-1B as a diagnostic biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma // *Biomark Res.* – 2018. – T. 6. – C. 25.
136. Shao D. D., Tsherniak A., Gopal S., Weir B. A., Tamayo P., Stransky N., Schumacher S. E., Zack T. I., Beroukhi R., Garraway L. A., Margolin A. A., Root D. E., Hahn W. C., Mesirov J. P. ATARiS: computational quantification of gene suppression phenotypes from multisample RNAi screens // *Genome Res.* – 2013. – T. 23, № 4. – C. 665-78.
137. Rebouissou S., Vasiliu V., Thomas C., Bellanne-Chantelot C., Bui H., Chretien Y., Timsit J., Rosty C., Laurent-Puig P., Chauveau D., Zucman-Rossi J. Germline hepatocyte nuclear factor 1alpha and 1beta mutations in renal cell carcinomas // *Hum Mol Genet.* – 2005. – T. 14, № 5. – C. 603-14.
138. Terasawa K., Toyota M., Sagae S., Ogi K., Suzuki H., Sonoda T., Akino K., Maruyama R., Nishikawa N., Imai K., Shinomura Y., Saito T., Tokino T. Epigenetic inactivation of TCF2 in ovarian cancer and various cancer cell lines // *Br J Cancer.* – 2006. – T. 94, № 6. – C. 914-21.
139. Silva T. D., Vidigal V. M., Felipe A. V., JM D. E. L., Neto R. A., Saad S. S., Forones N. M. DNA methylation as an epigenetic biomarker in colorectal cancer // *Oncol Lett.* – 2013. – T. 6, № 6. – C. 1687-1692.
140. Grisanzio C., Werner L., Takeda D., Awoyemi B. C., Pomerantz M. M., Yamada H., Sooriakumaran P., Robinson B. D., Leung R., Schinzel A. C., Mills I., Ross-Adams H., Neal D. E., Kido M., Yamamoto T., Petrozziello G., Stack E. C., Lis R., Kantoff P. W., Loda M., Sartor O., Egawa S., Tewari A. K., Hahn W. C., Freedman M. L. Genetic and functional analyses implicate the NUDT11, HNF1B, and SLC22A3 genes in prostate cancer pathogenesis // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2012. – T. 109, № 28. – C. 11252-7.
141. Kato N., Tamura G., Motoyama T. Hypomethylation of hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) CpG island in clear cell carcinoma of the ovary // *Virchows Arch.* – 2008. – T. 452, № 2. – C. 175-80.

142. Molecular cloning: a laboratory manual. / Sambrook J. F., EF Maniatis, T – second изд.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
143. Kawaguchi Y., Cooper B., Gannon M., Ray M., MacDonald R. J., Wright C. V. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors // *Nat Genet.* – 2002. – Т. 32, № 1. – С. 128-34.
144. Burlison J. S., Long Q., Fujitani Y., Wright C. V., Magnuson M. A. Pdx-1 and Ptf1a concurrently determine fate specification of pancreatic multipotent progenitor cells // *Dev Biol.* – 2008. – Т. 316, № 1. – С. 74-86.
145. Fujitani Y., Fujitani S., Boyer D. F., Gannon M., Kawaguchi Y., Ray M., Shiota M., Stein R. W., Magnuson M. A., Wright C. V. Targeted deletion of a cis-regulatory region reveals differential gene dosage requirements for Pdx1 in foregut organ differentiation and pancreas formation // *Genes Dev.* – 2006. – Т. 20, № 2. – С. 253-66.
146. Shroff S., Rashid A., Wang H., Katz M. H., Abbruzzese J. L., Fleming J. B., Wang H. SOX9: a useful marker for pancreatic ductal lineage of pancreatic neoplasms // *Hum Pathol.* – 2014. – Т. 45, № 3. – С. 456-63.
147. Krah N. M., De La O. J., Swift G. H., Hoang C. Q., Willet S. G., Chen Pan F., Cash G. M., Bronner M. P., Wright C. V., MacDonald R. J., Murtaugh L. C. The acinar differentiation determinant PTF1A inhibits initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma // *Elife.* – 2015. – Т. 4.
148. Wu J., Liu S., Yu J., Zhou G., Rao D., Jay C. M., Kumar P., Sanchez R., Templeton N., Senzer N., Maples P., Nemunaitis J., Brunicardi F. C. Vertically integrated translational studies of PDX1 as a therapeutic target for pancreatic cancer via a novel bifunctional RNAi platform // *Cancer Gene Ther.* – 2014. – Т. 21, № 2. – С. 48-53.
149. Janky R., Binda M. M., Allemeersch J., Van den Broeck A., Govaere O., Swinnen J. V., Roskams T., Aerts S., Topal B. Prognostic relevance of molecular subtypes and master regulators in pancreatic ductal adenocarcinoma // *BMC Cancer.* – 2016. – Т. 16. – С. 632.
150. Tanaka T., Kuroki T., Adachi T., Ono S., Hirabaru M., Soyama A., Kitasato A., Takatsuki M., Hayashi T., Eguchi S. Evaluation of SOX9 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma and intraductal papillary mucinous neoplasm // *Pancreas.* – 2013. – Т. 42, № 3. – С. 488-93.
151. Grimont A., Pinho A. V., Cowley M. J., Augereau C., Mawson A., Giry-Laterriere M., Van den Steen G., Waddell N., Pajic M., Sempoux C., Wu J., Grimmond S. M., Biankin A. V., Lemaigre F. P.,

- Rooman I., Jacquemin P. SOX9 regulates ERBB signalling in pancreatic cancer development // *Gut*. – 2015. – T. 64, № 11. – C. 1790-9.
152. Xia S., Feng Z., Qi X., Yin Y., Jin J., Wu Y., Wu H., Feng Y., Tao M. Clinical implication of Sox9 and activated Akt expression in pancreatic ductal adenocarcinoma // *Med Oncol*. – 2015. – T. 32, № 1. – C. 358.
153. Jiang S. S., Fang W. T., Hou Y. H., Huang S. F., Yen B. L., Chang J. L., Li S. M., Liu H. P., Liu Y. L., Huang C. T., Li Y. W., Jang T. H., Chan S. H., Yang S. J., Hsiung C. A., Wu C. W., Wang L. H., Chang I. S. Upregulation of SOX9 in lung adenocarcinoma and its involvement in the regulation of cell growth and tumorigenicity // *Clin Cancer Res*. – 2010. – T. 16, № 17. – C. 4363-73.
154. Shi G., Sohn K. C., Li Z., Choi D. K., Park Y. M., Kim J. H., Fan Y. M., Nam Y. H., Kim S., Im M., Lee Y., Seo Y. J., Kim C. D., Lee J. H. Expression and functional role of Sox9 in human epidermal keratinocytes // *PLoS One*. – 2013. – T. 8, № 1. – C. e54355.
155. Passeron T., Valencia J. C., Namiki T., Vieira W. D., Passeron H., Miyamura Y., Hearing V. J. Upregulation of SOX9 inhibits the growth of human and mouse melanomas and restores their sensitivity to retinoic acid // *J Clin Invest*. – 2009. – T. 119, № 4. – C. 954-63.
156. Xu Y. R., Yang W. X. SOX-mediated molecular crosstalk during the progression of tumorigenesis // *Semin Cell Dev Biol*. – 2017. – T. 63. – C. 23-34.
157. Zhou D., Bai F., Zhang X., Hu M., Zhao G., Zhao Z., Liu R. SOX10 is a novel oncogene in hepatocellular carcinoma through Wnt/beta-catenin/TCF4 cascade // *Tumour Biol*. – 2014. – T. 35, № 10. – C. 9935-40.
158. Sinha S., Leach S. D. New insights in the development of pancreatic cancer // *Curr Opin Gastroenterol*. – 2016. – T. 32, № 5. – C. 394-400.
159. Patra K. C., Bardeesy N., Mizukami Y. Diversity of Precursor Lesions For Pancreatic Cancer: The Genetics and Biology of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm // *Clin Transl Gastroenterol*. – 2017. – T. 8, № 4. – C. e86.
160. Reichert M., Blume K., Kleger A., Hartmann D., von Figura G. Developmental Pathways Direct Pancreatic Cancer Initiation from Its Cellular Origin // *Stem Cells Int*. – 2016. – T. 2016. – C. 9298535.
161. Fischer C. G., Wood L. D. From somatic mutation to early detection: insights from molecular characterization of pancreatic cancer precursor lesions // *J Pathol*. – 2018. – T. 246, № 4. – C. 395-404.

162. Mostafa M. E., Erbarut-Seven I., Pehlivanoglu B., Adsay V. Pathologic classification of "pancreatic cancers": current concepts and challenges // *Chin Clin Oncol.* – 2017. – T. 6, № 6. – C. 59.
163. Iacobas S., Ede N., Iacobas D. A. The Gene Master Regulators (GMR) Approach Provides Legitimate Targets for Personalized, Time-Sensitive Cancer Gene Therapy // *Genes (Basel).* – 2019. – T. 10, № 8.
164. Iacobas D. A., Tuli N. Y., Iacobas S., Rasamny J. K., Moscatello A., Geliebter J., Tiwari R. K. Gene master regulators of papillary and anaplastic thyroid cancers // *Oncotarget.* – 2018. – T. 9, № 2. – C. 2410-2424.
165. Diaferia G. R., Balestrieri C., Prosperini E., Nicoli P., Spaggiari P., Zerbi A., Natoli G. Dissection of transcriptional and cis-regulatory control of differentiation in human pancreatic cancer // *EMBO J.* – 2016. – T. 35, № 6. – C. 595-617.
166. Collisson E. A., Sadanandam A., Olson P., Gibb W. J., Truitt M., Gu S., Cooc J., Weinkle J., Kim G. E., Jakkula L., Feiler H. S., Ko A. H., Olshen A. B., Danenberg K. L., Tempero M. A., Spellman P. T., Hanahan D., Gray J. W. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy // *Nat Med.* – 2011. – T. 17, № 4. – C. 500-3.
167. Neureiter D., Zopf S., Dimmler A., Stintzing S., Hahn E. G., Kirchner T., Herold C., Ocker M. Different capabilities of morphological pattern formation and its association with the expression of differentiation markers in a xenograft model of human pancreatic cancer cell lines // *Pancreatology.* – 2005. – T. 5, № 4-5. – C. 387-97.
168. Gradiz R., Silva H. C., Carvalho L., Botelho M. F., Mota-Pinto A. MIA PaCa-2 and PANC-1 - pancreas ductal adenocarcinoma cell lines with neuroendocrine differentiation and somatostatin receptors // *Sci Rep.* – 2016. – T. 6. – C. 21648.
169. Wagenhäuser M. U., Rückert F., Niedergethmann M., Grützmann R., Saeger H. D. Distribution of Characteristic Mutations in Native Ductal Adenocarcinoma of the Pancreas and Pancreatic Cancer Cell Lines // *Cell Biol: Res Ther.* – 2013. – T. 2, № 1. – C. 1-5.
170. Deer E. L., Gonzalez-Hernandez J., Coursen J. D., Shea J. E., Ngatia J., Scaife C. L., Firpo M. A., Mulvihill S. J. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines // *Pancreas.* – 2010. – T. 39, № 4. – C. 425-35.

171. Brunner T. B., Cengel K. A., Hahn S. M., Wu J., Fraker D. L., McKenna W. G., Bernhard E. J. Pancreatic cancer cell radiation survival and prenyltransferase inhibition: the role of K-Ras // *Cancer Res.* – 2005. – Т. 65, № 18. – С. 8433-41.
172. Puls T. J., Tan X., Whittington C. F., Voytik-Harbin S. L. 3D collagen fibrillar microstructure guides pancreatic cancer cell phenotype and serves as a critical design parameter for phenotypic models of EMT // *PLoS One.* – 2017. – Т. 12, № 11. – С. e0188870.
173. Vergara D., Simeone P., Franck J., Trerotola M., Giudetti A., Capobianco L., Tinelli A., Bellomo C., Fournier I., Gaballo A., Alberti S., Salzet M., Maffia M. Translating epithelial mesenchymal transition markers into the clinic: Novel insights from proteomics // *EuPA Open Proteom.* – 2016. – Т. 10. – С. 31-41.
174. Зиновьева М. В., Костина М. Б., Чернов И. П., Кондратьева Л. Г., Свердлов Е. Д. KLF5, новый игрок и новая мишень в постоянно меняющемся составе молекулярных двигателей рака поджелудочной железы // *Биоорганическая Химия.* – 2016. – Т. 42, № 6. – С. 668-674.
175. Garg M. Epithelial-mesenchymal transition - activating transcription factors - multifunctional regulators in cancer // *World J Stem Cells.* – 2013. – Т. 5, № 4. – С. 188-95.
176. Nieto M. A. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells // *Science.* – 2013. – Т. 342, № 6159. – С. 1234850.
177. Виноградова Т. В., Чернов И. П., Монастырская Г. С., Кондратьева Л. Г., Свердлов Е. Д. Раковые стволовые клетки: пластичность против терапии // *ACTA NATURAE.* – 2015. – Т. 7, № 3 (26). – С. 156-166.
178. David C. J., Huang Y. H., Chen M., Su J., Zou Y., Bardeesy N., Iacobuzio-Donahue C. A., Massague J. TGF-beta Tumor Suppression through a Lethal EMT // *Cell.* – 2016. – Т. 164, № 5. – С. 1015-30.
179. Усова Е. В., Копанцева М. Р., Егоров В. И., Копанцев Е. П., Свердлов Е. Д. Белки SNAI1 и SNAI2 — транскрипционные мастер-регуляторы эпителиально-мезенхимального перехода // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* – 2015. – Т. 59, № 2. – С. 76–87.
180. Зиновьева М. В., Костина М. Б., Монастырская Г. С., Сасс А. В., Филюкова О. Б., Виноградова Т. В., Копанцев Е. П., Свердлов Е. Д. Генетические маркёры клеток общего предшественника лёгких и пищевода в развитии человека // *Доклады Академии Наук.* – 2015. – Т. 463, № 1. – С. 106–111.

181. Handorf A. M., Li W. J. Fibroblast growth factor-2 primes human mesenchymal stem cells for enhanced chondrogenesis // *PLoS One*. – 2011. – Т. 6, № 7. – С. e22887.
182. Кузьмич А. И., Тюлькина Д. В., Виноградова Т. В., Свердлов Е. Д. Пионер\_факторы транскрипции в нормальном развитии и в канцерогенезе // *Биоорганическая Химия*. – 2015. – Т. 41, № 6. – С. 636-643.
183. Tang Y., Shu G., Yuan X., Jing N., Song J. FOXA2 functions as a suppressor of tumor metastasis by inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition in human lung cancers // *Cell Res*. – 2011. – Т. 21, № 2. – С. 316-26.
184. Handley D. Systems Approach To Analyzing The TGFβ/SMAD3 gene Regulatory Pathway In A549 Cells // *Book Systems Approach To Analyzing The TGFβ/SMAD3 gene Regulatory Pathway In A549 Cells / Editor, 2008*.
185. Flagg A. E., Earley J. U., Svensson E. C. FOG-2 attenuates endothelial-to-mesenchymal transformation in the endocardial cushions of the developing heart // *Dev Biol*. – 2007. – Т. 304, № 1. – С. 308-16.
186. Yu J., Liu S. H., Sanchez R., Nemunaitis J., Rozengurt E., Brunicardi F. C. PDX1 associated therapy in translational medicine // *Ann Transl Med*. – 2016. – Т. 4, № 11. – С. 214.
187. Rosenbloom K. R., Armstrong, J., Barber, G. P., Casper, J., Clawson, H., Diekhans, M., ... & Harte, R. A. The UCSC genome browser database: 2015 update. // *Nucleic acids research*. – 2015. – Т. 43. – С. D670-81.
188. Hayes H. L., Moss L. G., Schisler J. C., Haldeman J. M., Zhang Z., Rosenberg P. B., Newgard C. B., Hohmeier H. E. Pdx-1 activates islet alpha- and beta-cell proliferation via a mechanism regulated by transient receptor potential cation channels 3 and 6 and extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 // *Mol Cell Biol*. – 2013. – Т. 33, № 20. – С. 4017-29.
189. Fendrich V., Lauth M. The role of pancreatic and duodenal homeobox 1 as a therapeutic target in pancreatic cancer // *Expert Opin Ther Targets*. – 2014. – Т. 18, № 11. – С. 1277-83.
190. Le Large T. Y. S., Bijlsma M. F., Kazemier G., van Laarhoven H. W. M., Giovannetti E., Jimenez C. R. Key biological processes driving metastatic spread of pancreatic cancer as identified by multi-omics studies // *Semin Cancer Biol*. – 2017. – Т. 44. – С. 153-169.
191. Fischer K. R., Durrans A., Lee S., Sheng J., Li F., Wong S. T., Choi H., El Rayes T., Ryu S., Troeger J., Schwabe R. F., Vahdat L. T., Altorki N. K., Mittal V., Gao D. Epithelial-to-mesenchymal

transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance // *Nature*. – 2015. – T. 527, № 7579. – C. 472-6.

192. Zheng X., Carstens J. L., Kim J., Scheible M., Kaye J., Sugimoto H., Wu C. C., LeBleu V. S., Kalluri R. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer // *Nature*. – 2015. – T. 527, № 7579. – C. 525-530.

193. Chen Y., LeBleu V. S., Carstens J. L., Sugimoto H., Zheng X., Malasi S., Saur D., Kalluri R. Dual reporter genetic mouse models of pancreatic cancer identify an epithelial-to-mesenchymal transition-independent metastasis program // *EMBO Mol Med*. – 2018. – T. 10, № 10.

194. Krebs A. M., Mitschke J., Lasierra Losada M., Schmalhofer O., Boerries M., Busch H., Boettcher M., Mougiakakos D., Reichardt W., Bronsert P., Brunton V. G., Pilarsky C., Winkler T. H., Brabletz S., Stemmler M. P., Brabletz T. The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer // *Nat Cell Biol*. – 2017. – T. 19, № 5. – C. 518-529.