

DOI: 10.31116/tsitol.2018.06.03

ЭКСПРЕССИЯ ЭНДОГЛИНА КУЛЬТИВИРУЕМЫМИ НЕТРАНСФОРМИРОВАННЫМИ И ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ РАЗНОГО ГИСТОГЕНЕЗА

© М. П. Самойлович,^{1, 2, *} А. А. Пиневиц,^{1, 2} Н. Л. Вартамян,¹
И. В. Смирнов,¹ И. Ю. Крутецкая,¹ А. Ю. Столбовая,¹ О. А. Шашкова,¹
И. В. Грязева,¹ М. А. Берлина,¹ Т. Д. Смирнова,³ В. Б. Климович¹

¹Российский научный центр радиологии и хирургических технологий
им. акад. А. М. Гранова Министерства здравоохранения РФ, С.-Петербург, 197758,

²С.-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034, и

³Научно-исследовательский институт гриппа Министерства здравоохранения РФ,
Санкт-Петербург, 197376;

* электронный адрес: mpsamoylovich@gmail.com

Трансмембранный белок эндоглин (CD105) — компонент рецепторного комплекса ростовых факторов семейства TGF- β , который экспрессирован преимущественно на клетках эндотелия, мезенхимных стромальных клетках и ранних гемопоэтических предшественниках. На мембранах пролиферирующего эндотелия плотность CD105 возрастает. Растворимый эндоглин (sEng) образуется при отщеплении экстраклеточного фрагмента белка металлопротеиназой MMP-14, и его уровень в крови рассматривают как показатель ангиогенеза при развитии некоторых опухолей. Вклад самих опухолевых клеток в пул sEng остается неизвестным. На коллекции из 43 культур нетрансформированных и опухолевых клеток разного гистогенеза исследовали экспрессию CD105, образование sEng, уровень мРНК сплайсинг-вариантов гена эндоглина и гена *MMP-14*. Более половины исследованных линий опухолевых клеток, а также культуры нетрансформированных стромальных клеток содержали клеточные популяции, имеющие мембранный эндоглин. Цитоплазматический эндоглин, функция которого неизвестна, был обнаружен в клетках трех опухолевых линий. Во всех клеточных линиях экспрессия мРНК L-эндоглина преобладала над экспрессией S-эндоглина. Впервые в стромальных и опухолевых клетках было исследовано образование sEng и показано, что основным его источником являются клетки эндотелия, тогда как большинство опухолевых клеток CD105⁺ и нетрансформированные стромальные клетки продуцируют растворимый эндоглин на низком уровне. Среди опухолевых линий наивысшая концентрация sEng была обнаружена в культуре меланомы MeWo, в клетках которой была наиболее высокая экспрессия гена *MMP-14*.

Ключевые слова: клеточные линии, мезенхимные стромальные клетки, опухолевые клетки, эндотелий, эндоглин, L-эндоглин, S-эндоглин, CD105, ген *MMP-14*.

Принятые сокращения: ЭТС — эмбриональная телячья сыворотка, sEng — растворимый эндоглин.

Эндоглин — мембранный гликопротеин (CD105), который является компонентом рецепторных комплексов для ростовых факторов TGF- β 1, TGF- β 3, BMP-2, BMP-7, BMP-9, BMP-10 и активина А. В составе этих комплексов эндоглин выполняет роль молекулы, направляющей проведение клеточных сигналов по пути активации пролиферации или состояния покоя. Эндоглин вовлечен также в адгезионные взаимодействия клеток между собой и с межклеточным матриксом благодаря наличию в его составе связывающего интегрин триплета аминокислот RGD.

Во взрослом организме CD105 экспрессирован преимущественно на мембране клеток сосудистого эндотелия, на поверхности мезенхимных стромальных и гладкомышечных клеток, а также на ранних предшественниках гемопоэтического ростка (Fonsatti, Maio, 2004). Плотность молекул CD105 значительно возрастает на активирован-

ном эндотелии, что наблюдается в сосудах ишемизированных тканей, в местах тканевой репарации, а также в сосудах растущих опухолей (Brewer et al., 2000; Kassouf et al., 2004; Erdem et al., 2006). В связи с этим CD105 рассматривают как маркер ангиогенеза, связанного с ростом опухоли, а также как потенциальную мишень антиангиогенной терапии солидных новообразований (Fonsatti et al., 2003; Raauwe et al., 2013).

Экспрессия CD105 выявлена в ряде опухолевых клеток разного гистогенеза. В одних случаях эти опухоли происходили из клеток, которые в норме экспрессировали эндоглин. К таковым относятся миеломоноцитарные и пре-B-клеточные лейкомии (Quackenbush, Letarte, 1985; Naruta, Seon, 1986). В других случаях нормальные прототипы опухолевых клеток не экспрессировали CD105, и белок появлялся только в результате опухолевой трансформации (Liu et al., 2002). Спектр линий опухолевых

клеток, в которых было показано присутствие эндоглина, весьма невелик, а факторы, способные влиять на его экспрессию опухолевыми клеткам, остаются неизвестными.

Эндоглин клеточных мембран может быть представлен в одной из двух изоформ, которые различаются размером цитоплазматического участка полипептидной цепи. Обе изоформы эндоглина — длинная (L-эндоглин) и короткая (S-эндоглин) — образуются в результате альтернативного сплайсинга единого гена. Соотношение S-эндоглин/L-эндоглин определяет баланс между активностью сигнальных путей в клетках (Blanko et al., 2008; Velasco et al., 2008).

Растворимая форма эндоглина (sEng) образуется в результате протеолитического отщепления экстраклеточного участка молекулы белка. Этот процесс, называемый также шеддингом, происходит под действием металлопротеиназы MMP-14, которая отщепляет полипептидную цепь эндоглина в непосредственной близости от клеточной мембраны (Kumar et al., 2014). До настоящего времени не описано других ферментов, которые могут участвовать в образовании sEng. Процесс шеддинга эндоглина изучен на культивируемых клетках эндотелия, но остается практически неисследованным на других клетках, экспрессирующих эндоглин, как нормальных, так и опухолевых.

В настоящей работе на коллекции культур нетрансформированных и опухолевых клеток разного гистогенеза исследованы экспрессия мембранного антигена CD105, экспрессия сплайсинг-вариантов гена эндоглина, образование растворимой формы эндоглина (sEng) и активность гена *MMP-14*.

Материал и методика

Клеточные линии и условия культивирования. Названия исследованных клеточных линий и их гистогенетическое происхождение даны в табл. 1.

Мезенхимные стромальные клетки были выделены из не затронутой опухолевым процессом подкожной жировой ткани операционного материала семи пациенток с опухолью молочной железы. Пять культур были получены из висцеральной жировой ткани пациентов с опухолями почек. Процедура выделения и культивирования этих клеток, а также их основные характеристики даны в предыдущих работах (Пиневиц и др., 2014, 2015). Клетки исследовали на 3—6-м пассажах культивирования.

Для выращивания клеток использовали вентилируемые пластиковые флаконы Orange Scientific и NUNC DELTA. Все клетки культивировали в инкубаторах при 6 % CO₂, 37 °C, влажности 100 % и в воздушной фазе. Ростовые среды с эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) (см. табл. 1) не содержали антибиотиков. Для пересева монослойных культур применяли раствор трипсина с версеном. Время инкубации, необходимое для снятия клеток с поверхности флаконов, подбирали эмпирически.

Исследование активности генов методом ПЦР в режиме реального времени. РНК выделяли с помощью TRIzol Reagent согласно рекомендациям фирмы-производителя. Качество РНК оценивали в соответствии с общепринятыми требованиями (Nolan et al., 2006). В реакции обратной транскрипции использовали 500 нг РНК. Реакционная смесь включала в себя 40 ед. M-MuLV обратной транскриптазы, 1 ммоль смеси dNTP,

0.2 мкг random-праймера, 20 ед. ингибитора РНКаз RiboLock RNase inhibitor и деионизированную воду.

Реакцию обратной транскрипции вели в соответствии с рекомендациями производителя фермента. ПЦР в реальном времени проводили на термоциклере CFX96 Touch (Bio-Rad) в объеме 25 мкл в 96-луночных ПЦР-планшетах. Реакционная смесь состояла из 0.5 мкл кДНК, полученной в реакции обратной транскрипции, буфера для Hot-start Taq-ДНК-полимеразы, 0.8 ммоль смеси dNTP, 4 ммоль MgCl₂, 1 ед. Hot-start Taq-ДНК-полимеразы, 1 мкл SYBR Green и деионизированной воды. В реакции использовали заранее подобранные концентрации праймеров в диапазоне 200—300 нМ. Последовательности праймеров (табл. 2) были заимствованы из Банка праймеров Harvard Medical School (США) и синтезированы фирмой АлкорБио (Россия). После денатурации при 95 °C в течение 10 мин проводили 40 циклов амплификации в следующем режиме: плавление при 95 °C, 30 с—отжиг при 56 °C, 30 с—синтез при 72 °C, 30 с. На предварительном этапе во всех клеточных линиях определяли активность гена *GAPDH*, который в дальнейшем использовали в качестве гена сравнения.

Экспрессию мРНК эндоглина оценивали с использованием двух комбинаций праймеров. В ходе альтернативного сплайсинга в мРНК эндоглина может сохраняться короткий интрон, расположенный между экзонами XIV и XV, что приводит к появлению преждевременного стоп-кодона и синтезу укороченной S-изоформы белка (рис. 1). Праймеры для ПЦР в реальном времени подобраны таким образом, чтобы амплифицируемый фрагмент находился в общей для двух изоформ части мРНК (ампликон LS-Eng) или включал в себя часть последовательности интрона короткой изоформы белка (ампликон S-Eng). Таким образом, первый вариант постановки ПЦР позволяет оценить суммарную экспрессию двух изоформ эндоглина, а второй — только короткой.

Уровни активности генов *Eng* и *MMP-14* представляли в виде разницы (ΔCT) между пороговым циклом исследуемого гена и гена сравнения *GAPDH*, где CT — пороговый цикл, соответствующий числу циклов амплификации, необходимых для достижения порогового значения флуоресценции. Соответственно чем больше в клетке синтезировалось мРНК исследуемого гена, тем выше был уровень активности этого гена и тем меньше было значение ΔCT .

Выявление эндоглина на мембране и в цитоплазме клеток. Клетки суспензионных культур отмывали от ростовой среды двукратным центрифугированием в растворе Dulbecco, не содержащем ионов Ca²⁺ и Mg²⁺ (PBS). Клетки монослойных культур снимали с подложки инкубацией в растворе смеси трипсина с версеном. Для выявления эндоглина на клеточной мембране клетки инкубировали в течение 1 ч при 4 °C с мечеными фикоэритрином моноклональными антителами против CD105 (IOTest® CD105-PE, PN A07414, Clone 1G2), растворенными в PBS, содержащем 10 % ЭТС и азид натрия. Для выявления эндоглина в цитоплазме клеток отмывые от ростовой среды клеточные суспензии инкубировали 10 мин при комнатной температуре в пермеабилизирующем растворе (BD FACS™ Permeabilizing Solution 2), затем в растворе антител CD105-PE в течение 1 ч при 4 °C. Клетки, отмывые от антител, суспендировали в жидкости для проточного цитометра (BD FACSFlo™) и анализировали с помощью BD FACSAria III. В качестве изотипического контроля использовали меченные фико-

**Гистогенетическое происхождение клеточных культур, состав ростовых сред
и источники получения клеточных линий**

Название линии	Гистогенетическое происхождение	Состав ростовой среды	Источник получения
ASC	Мезенхимные стромальные клетки из жировой ткани	DMEM-F12 + 10 % ЭТС	1 (Пиневич и др., 2014, 2015)
FLECH	Фибробласты легкого эмбриона человека	α -MEM + 10 % ЭТС	2
HEK293	Почка эмбриона	DMEM + 5 % ЭТС	3
EA.hy926	Эндотелий (гибридома HUVEC с A549)	DMEM-F12 + 10 % ЭТС	4
Mg63	Остеосаркома	α -MEM + 5 % ЭТС	2
U-2-OS	То же	RPMI + 10 % ЭТС	2
RD	Эмбриональная рабдомиосаркома	α -MEM + 5 % ЭТС	2
HEP-G2	Карцинома печени	α -MEM + 10 % ЭТС	2
T24	Карцинома мочевого пузыря	α -MEM + 5 % ЭТС	2
MCF-7	Карцинома молочной железы	α -MEM + 10 % ЭТС + инсулин, 10 мкг/мл + пируват, 1 ммоль	3
MIA PaCa-2	Аденокарцинома поджелудочной железы	RPMI + α -MEM + 5 % ЭТС	2
Sarpan-2	То же	RPMI + 10 % ЭТС	2
CaCo2	Аденокарцинома ободочной кишки	α -MEM + 10 % ЭТС	2
A549	Карцинома легкого, партнер при получении линии EA.hy926	α -MEM + 5 % ЭТС	2
A172	Мультиформная глиома	То же	2
T98G	То же	» »	2
T2	» »	» »	1 (Киселева и др., 2017)
R1	» »	» »	То же
U937	Промоноцитарная лейкемия	RPMI + 5 % ЭТС	2
HL-60	Промиелоцитарная лейкемия	RPMI + 10 % ЭТС	2
Kg-1	Миелоцитарная лейкемия	То же	2
THP-1	Моноцитарная лейкемия	RPMI + 5 % ЭТС	3
K562	Эритробластная лейкемия	RPMI + 10 % ЭТС	2
Jurkat	T-лимфобластоидная	RPMI + 5 % ЭТС	2
IM-9	B-лимфобластоидная, продуцирующая IgG	То же	3
NC-37	B-лимфобластоидная, продуцирующая IgM, immortalized вирусом Эпштейна—Барр	» »	3
Namalwa	То же	» »	3
RPMI 1788	» »	» »	3
U266	Миелома, продуцирующая IgE	» »	3
Y-79	Ретинобластома	RPMI + 10 % ЭТС	2
SKN-MC	Нейробластома	RPMI + α -MEM + 5 % ЭТС	2
MeWo	Непродуцирующая меланин меланома	α -MEM + 5 % ЭТС	2

Примечание. 1 — Лаборатория гибридной технологии, РНЦРХТ им. акад. А. М. Гранова МЗ РФ, Санкт-Петербург; 2 — Российская коллекция клеточных культур (НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург); 3 — Российская коллекция клеточных культур клеток позвоничных (ИИЦ РАН, Санкт-Петербург); 4 — И. С. Фрейдлин (ИЭМ, Санкт-Петербург), с разрешения автора С. J. Edgell (Edgell et al., 1983).

эритромином мышинные антитела, не распознающие эндоглин (PE Mouse IgG1, Isotype Control, Clone MOPC-21). При обработке результатов анализа пользовались программным обеспечением BD FACSDiva software version 7.0.

Измерение концентрации растворимого эндоглина. Клетки монослойных культур засеивали в ячейки 96-луночного планшета в такой посевной дозе, чтобы через 24 ч формировался конfluence-монослой. Тогда заменяли среду на 100 мкл свежей ростовой среды и продолжали культивирование. Пробы среды со-

бирали через 1, 2, 4 и 6 сут культивирования. Для каждой временной точки использовали по три независимых ячейки с клетками, засеянными в один день. При работе с суспензионными культурами клетки рассеивали в ячейки 24-луночного планшета из расчета, что через 24 ч они достигнут максимальной концентрации. Образцы культуральных жидкостей собирали в те же сроки, что и для монослойных культур, для чего отделяли клетки от среды путем центрифугирования (100 g, 5 мин). Все образцы культуральных жидкостей хранили при -20°C и размораживали в день исследования.

Таблица 2

Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для оценки экспрессии мРНК методом ПЦР в реальном времени

мРНК	Праймер	Последовательности нуклеотидов
<i>Eng-S</i> ^a	Прямой	TCATCAGCCCTGACCTGTCT
	Обратный	GCATGCTCACTGTGGGGG
<i>Eng-LS</i> ^b	Прямой	CGGGTCTCAAGACCAGGAAG
	Обратный	GAGGAAGGCACCAAAGGTGA
<i>MMP-14</i>	Прямой	GGCTACAGCAATATGGCTACC
	Обратный	GATGGCCGCTGAGAGTGAC
<i>GAPDH</i>	Прямой	GTGAACCATGAGAAGTATGACAAC
	Обратный	CATGAGTCCTCCACGATACC

Примечание. ^a Специфические праймеры, позволяющие амплифицировать мРНК S-эндоглина; ^b общие праймеры для одновременной амплификации мРНК S- и L-эндоглинов.

Концентрацию эндоглина в образцах определяли с помощью нового высокочувствительного двухцентрового варианта иммуноферментного анализа (ИФА), разработанного на основе созданных в лаборатории моноклональных антител против эндоглина (Смирнов и др., 2015; Smirnov et al., 2016). Калибрующим образцом служил препарат рекомбинантного эндоглина (R&D Systems, 1097-EN-025). Перед постановкой реакции все образцы разводили в 2 раза с помощью трис-солевого буферного раствора, содержащего твин-20.

Визуализацию данных осуществляли с помощью статистического языка программирования R (версия 3.4.3) с применением графических пакетов ggplot2 и cowplot (доступны на CRAN).

Использованные реактивы: среда α -MEM с глутамином, среда DMEM-F12 с глутамином, среда RPMI-1640 с глутамином, раствор Дульбекко DPBS 1-кратный без Ca^{2+} и Mg^{2+} , раствор трипсина-версена (1:1), сыворотка эмбриональная телячья (Биолот, Россия); TRIzol Reagent (Life Technologies, США); M-MuLV обратной транскриптазы, смесь dNTP, random-праймер, Hot-start Taq-ДНК-полимераза, буфер для Hot-start

Taq-ДНК-полимераза, раствор MgCl_2 (Сибэнзим, Россия); Sybr Green (BioDye, Россия); RiboLock RNase inhibitor, ЭТС Hyclone (Thermo Scientific, США); меченные фикоэритрином моноклональные мышинные антитела к CD105 (clone 1G2, IOTest®, США), меченные фикоэритрином антитела изотипического контроля (clone MOPC-21, Becton Dickinson, США); BD FACSTTM Permeabilizing Solution 2, BD FACSTTM Sheath Fluid (Becton Dickinson, США); азид натрия, Tween-20 (Sigma, США); Recombinant Human Endoglin/CD105 Protein (R&D Systems, США).

Результаты

Экспрессия мРНК L-эндоглина и S-эндоглина нетрансформированными и опухолевыми клетками. Первый этап изучения экспрессии эндоглина в линиях опухолевых и нормальных клеток состоял в оценке экспрессии общей мРНК эндоглина, которая определяла суммарный синтез S- и L-изоформ белка. Активность гена эндоглина расценивали как высокую, если показатель экспрессии (ΔCT) был ниже 6.5, тогда как значение выше 14.0 соответствовало неактивному состоянию гена (рис. 2, а). В клетках эритробластной лейкемии, в производных В-лимфоидных клеток, продуцирующих иммуноглобулины, в Т-лимфобластоидных клетках, в пяти линиях карцином и в одной из сарком ген эндоглина не экспрессировался. В клетках карциномы легкого A549, которые служили опухолевым партнером при создании перевиваемой эндотелиальной линии EA.hy926, ген эндоглина также не был активным. Наибольший уровень мРНК эндоглина был выявлен в эндотелиальных клетках EA.hy926 и в первичных линиях мезенхимных стромальных клеток (ASC). Здесь и далее представлены средние значения, полученные при статистической обработке исследований двенадцати культур ASC. Активность гена эндоглина была также высокой в нетрансформированных фибробластах линии FLECH, в клетках двух линий сарком Mg63 и RD, в меланоме MeWo, в карциноме T24 и клетках гемопоэтического ряда THP-1 и Kg-1. Меньший уровень мРНК был обнаружен в глиобlastомах A172, T2 и R1, в карциномах

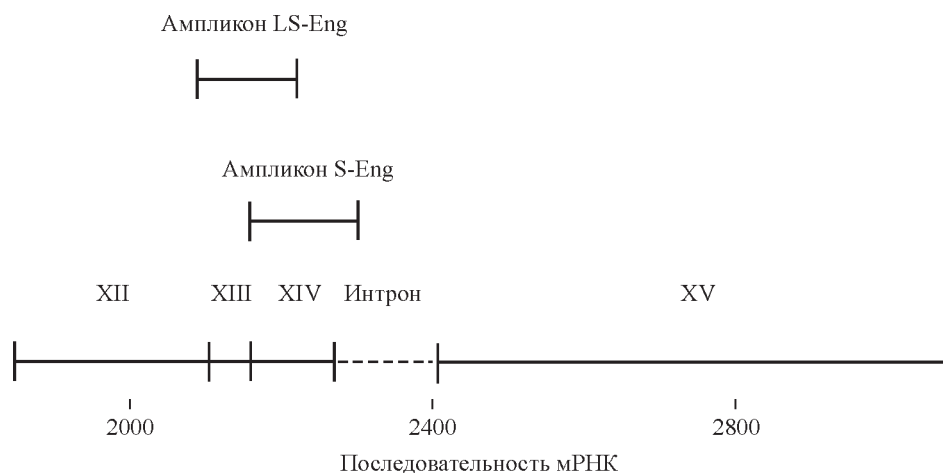


Рис. 1. Схематическое изображение последовательности мРНК эндоглина и местонахождения ее фрагментов, амплифицируемых при постановке ПЦР в реальном времени.

Римскими цифрами обозначены номера экзонов.

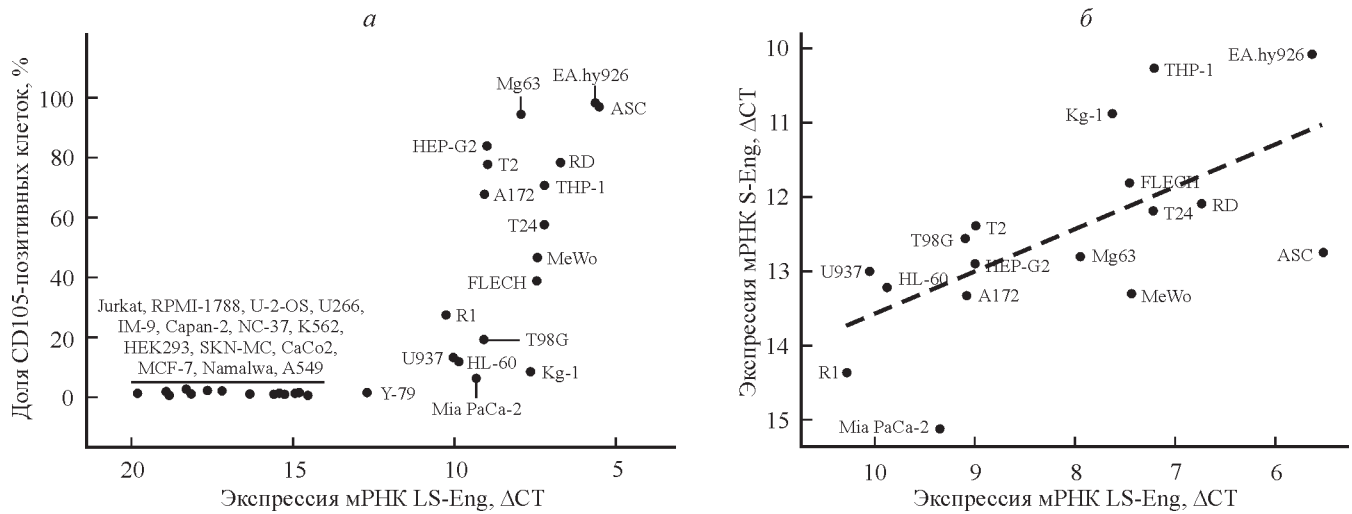


Рис. 2. Сопоставление экспрессии общей мРНК эндоглина (LS-Eng) в разных линиях нетрансформированных и опухолевых клеток с долей клеток CD105⁺ в популяции (а) и с экспрессией мРНК S-эндоглина (S-Eng) (б).

Здесь и на рис. 5: ΔCT — разница между пороговым циклом исследуемого гена и гена сравнения *GAPDH* (ПЦР в режиме реального времени). Штриховая линия соответствует линии тренда.

HEP-G2 и MIA PaCa-2, а также в двух линиях гемопоэтического роста (U937 и Kg-1).

Сопоставление активности вариантов сплайсинга гена эндоглина показало, что во всех клеточных культурах преобладала экспрессия мРНК L-эндоглина, при этом уровень мРНК S-эндоглина был различным (рис. 2, б). В клетках эндотелия EA.hy926 и в двух культурах гемопоэтического происхождения — Kg-1 и THP-1 — он был выше, чем в остальных клетках. Контраст эндотелию составляли клетки глиобластомы R1 и аденокарциномы поджелудочной железы MIA PaCa-2, в которых синтез короткой изоформы эндоглина полностью отсутствовал.

Экспрессия мембранной формы эндоглина — CD105 — в нетрансформированных и опухолевых клетках. Экспрессию антигена CD105 на мембранах живых клеток определяли методом проточной иммуноцитофлуориметрии (рис. 3). Примерно половина исследованных клеточных культур не содержала CD105⁺-клеток. Все эти культуры относились к числу тех, в которых не было выявлено мРНК эндоглина. Кле-

точные культуры, в которых более половины популяции составляли CD105⁺-клетки, имели высокую экспрессию мРНК эндоглина. К их числу относились культуры мезенхимных стромальных клеток ASC и клеток эндотелия EA.hy926, популяции которых содержали более 90 % CD105⁺-клеток. Столь же высокое содержание клеток CD105⁺ и высокий уровень экспрессии мРНК эндоглина были выявлены в клетках остеосаркомы Mg63. Более 40 % клеток, несущих мембранный CD105, и высокая активность гена были обнаружены в культуре эмбриональной рабдомиосаркомы RD, в двух линиях карцином (HEP-G2 и T24), в клетках THP-1, полученных из моноцитарной лейкемии, в глиобlastомах A172 и T2, меланоме MeWo и в нетрансформированных эмбриональных фибробластах FLECH. В нескольких клеточных линиях было отмечено низкое содержание CD105⁺-клеток (5—25 %) и одновременно активное состояние гена эндоглина, что требовало специального рассмотрения.

В линии глиобластомы T98G высокое содержание мРНК эндоглина сочеталось с низким содержанием клеток, несущих CD105. Гетерогенная по клеточному соста-

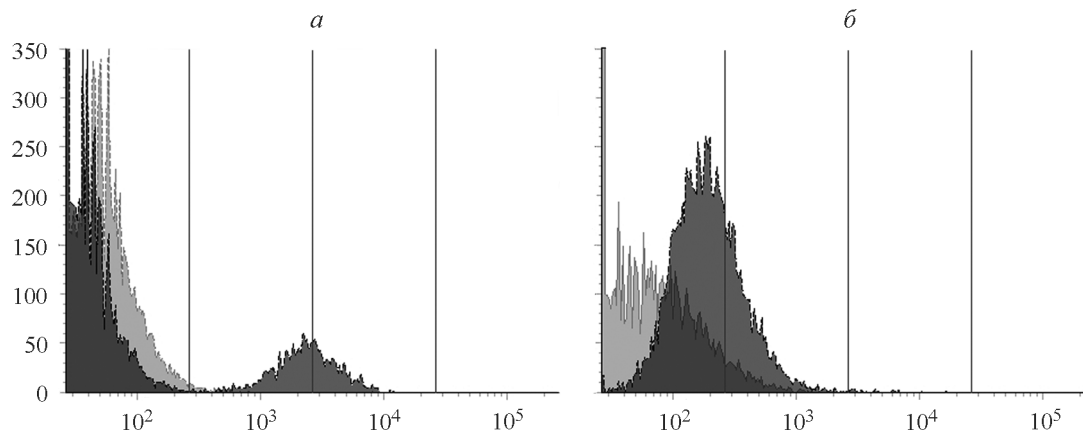


Рис. 3. Гистограммы распределения CD105 на поверхности (серая диаграмма) и в цитоплазме (черная диаграмма) клеток линии глиобластомы T98G (а) и промиелоцитарной лейкемии Kg-1 (б).

По горизонтали — интенсивность флуоресценции, усл. ед.; по вертикали — число событий.

ву линия глиобластомы содержала малую по численности популяцию клеток, имеющих высокую плотность мембранного рецептора (рис. 3, а). В линии Kg-1, произошедшей из клеток костного мозга пациента с миелодисплазией, мембранный антиген CD105 был выявлен менее чем на 10 % клеток, тогда как у 30 % популяции содержался эндоглин в цитоплазме (рис. 3, б). Такая же ситуация наблюдалась и с клетками линий промиелоцитарной лейкемии HL-60, а также карциномы поджелудочной железы MIA PaCa-2. В клетках ретинобластомы Y-79 не удалось выявить ни мембранный, ни внутриклеточный эндоглин, при том что в них был обнаружен невысокий уровень мРНК эндоглина.

Накопление sEng и активность гена *MMP-14* в культурах нетрансформированных и опухолевых клеточных линий. Оценку интенсивности освобождения эндоглина с клеточной мембраны выполняли с помощью двухцентрового ИФА, определяя концентрацию эндоглина, накапливающегося в ростовой среде за 144 ч культивирования клеток. Наиболее высокое содержание эндоглина (до 25 нг/мл) было обнаружено в среде культивирования клеток эндотелия EA.hy926 (рис. 4; 5, а). По этому показателю клетки эндотелия значимо отличались от клеток всех остальных линий, в том числе и от ASC, в среде которых концентрация эндоглина не превышала 3 нг/мл.

При сопоставлении уровня экспрессии молекул CD105 на клеточной мембране и концентрации растворимого эндоглина, освобождаемого в ростовую среду, заметно выделялись клетки меланомы MeWo (рис. 5, а). В этой линии CD105⁺-клетки составляли меньше половины популяции, но в среде культивирования определялась концентрация sEng, которая в разы превышала аналогичный показатель для других линий, не считая эндотелия. Такой результат мог быть следствием того, что линия меланомы содержит небольшую популяцию кле-

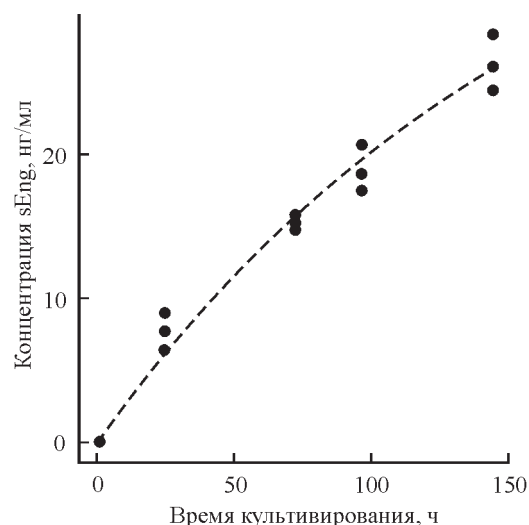


Рис. 4. Динамика накопления sEng в среде культивирования клеток эндотелия EA.hy926.

ток с высокой плотностью мембранного CD105. В культуре меланомы данные иммуноцитофлуориметрии не выявили клеточной популяции, имеющей высокую плотность мембранного эндоглина (рис. 6).

Для сравнения: линия остеосаркомы Mg63 содержала более 90 % CD105⁺-клеток, дающих при связывании меченых анти-CD105 антител более высокий сигнал флуоресценции, чем клетки MeWo. При этом культура остеосаркомы освобождала в среду культивирования значительно меньше sEng, чем клетки меланомы. Образование растворимого эндоглина связано с протеолитической активностью фермента *MMP-14*. Было установлено, что клетки меланомы MeWo имеют самую высокую среди всех исследованных клеточных линий активность гена

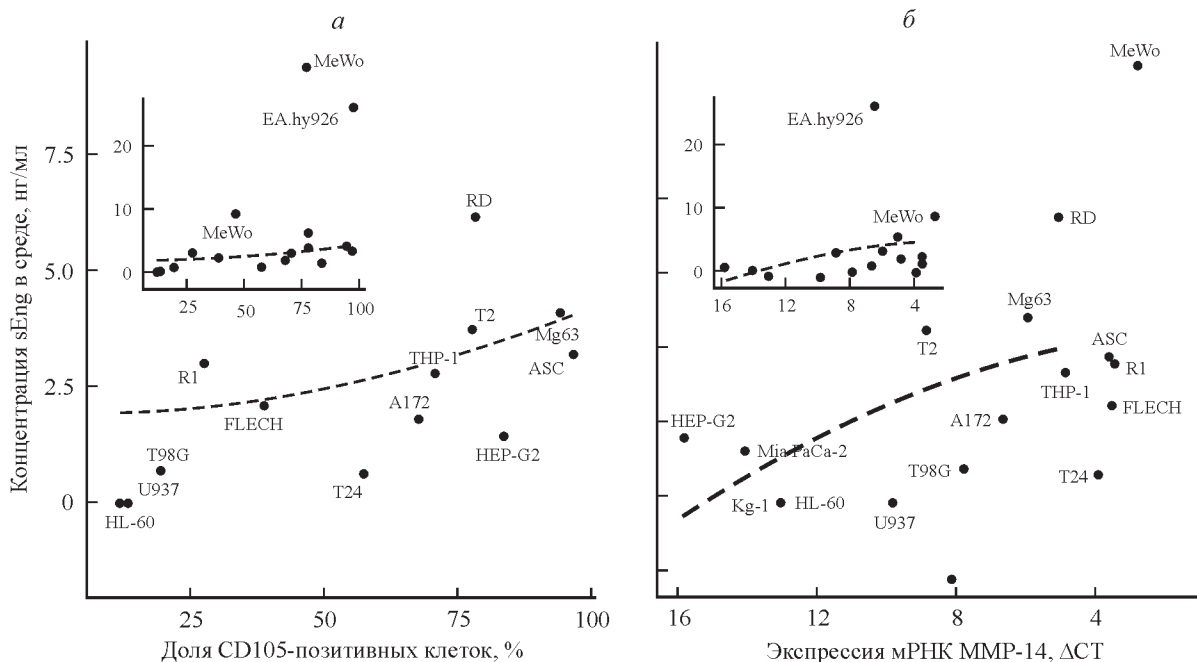


Рис. 5. Сопоставление концентрации sEng в среде культивирования с относительной долей CD105⁺-клеток (а) или с экспрессией гена *MMP-14* (б) в клеточной популяции.

На врезках, имеющих другой масштаб по оси ординат, добавлены результаты для клеток эндотелия EA.hy926. Штриховые линии соответствуют линиям тренда.

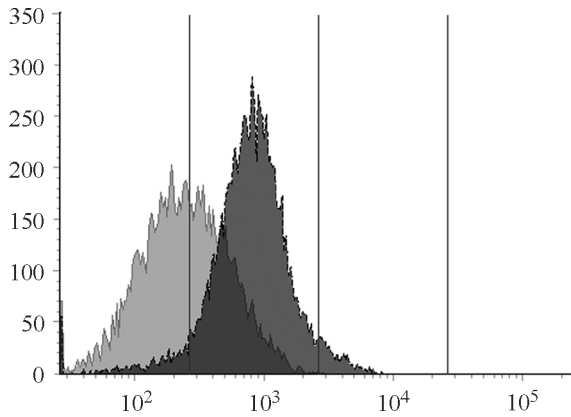


Рис. 6. Гистограммы распределения клеток CD105⁺ в популяции остеосаркомы Mg63 (черная диаграмма) и меланомы MeWo (серая диаграмма).

По горизонтали — интенсивность флуоресценции, усл. ед.; по вертикали — число событий.

MMP-14 (рис. 5, б). В клетках меланомы она была выше, чем в клетках эндотелия или в мезенхимных стромальных клетках. Линия гепатокарциномы HEP-G2, в которой более 75 % клеток являлись CD105⁺, продуцировала мало sEng и имела низкий уровень экспрессии гена *MMP-14*. В культурах ASC уровень продукции sEng был низким по сравнению с культурой эндотелия EA.hy926. Популяции мезенхимных стромальных клеток, как и клетки эндотелия, содержали более 90 % CD105⁺-клеток, имели одинаковый по силе сигнал флуоресценции и одинаково высокий уровень активности гена *MMP-14*. Возможно, что низкое содержание растворимого эндоглина в ростовой среде мезенхимных клеток связано с относительно крупными их размерами и как следствие — с меньшей суммарной поверхностью клеток при достижении конfluenceнтного монослоя.

Обсуждение

Роль эндоглина в канцерогенезе первоначально рассматривали с точки зрения его участия в образовании сосудов, питающих опухоль (Wang et al., 1993; Zijlman et al., 2009). Затем выяснилось, что клетки ряда опухолей сами экспрессируют эндоглин. В одних случаях, например на клетках промиелоцитарных, промиоцитарных и проэритробластных лейкоцитов, экспрессия эндоглина была следствием малигнизации предшественников гемопоэтических клеток ранних стадий дифференцировки, которые экспрессируют эндоглин в норме. В других случаях эндоглин был выявлен на мембранах клеток тех опухолей, нормальные прототипы которых не экспрессируют этого белка. К таким опухолям относятся в первую очередь карциномы — опухоли эпителиального происхождения, такие как рак молочной и поджелудочной желез, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак эндометрия и рак простаты (Zakrzewski et al., 2011; Oliveira et al., 2014; Tobar et al., 2014). В процессе опухолевой прогрессии эти клетки могли терять экспрессию эндоглина. Данные о значении эндоглина для прогрессии, метастазирования и инвазивности опухолей достаточно противоречивы. Экспрессия эндоглина клетками некоторых опухолей была сопряжена с увеличением их инвазивности (Oxmann

et al., 2008), а ингибирование экспрессии эндоглина могло увеличивать чувствительность клеток к химиотерапевтическим препаратам и вести к подавлению роста опухолей (Pal et al., 2014). На линиях клеток рака простаты наблюдали обратный эффект, когда потеря экспрессии эндоглина была сопряжена с приобретением клетками большей миграционной способности и метастатической активности (Liu et al., 2002). Экспрессию эндоглина на клетках ряда опухолей связывают с участием TGF-β1 в регуляции их роста. Так, клетки меланомы линии Mel 97, содержащие популяции CD105⁺-клеток, снижали пролиферативную активность при добавлении экзогенного TGF-β, тогда как неэкспрессирующая эндоглин меланома FO-1 не отвечала на действие этого цитокина (Altomonte et al., 1996). Было высказано предположение о том, что для одних опухолей эндоглин может служить онкосупрессором, а для других — промотором метастазирования (Perez-Gomez et al., 2010).

В 2005 г. было опубликовано исследование экспрессии CD105 в линиях опухолевых клеток разного гистогенеза (Postiglione et al., 2005). Авторы отмечали, что саркомы, как правило, высокопозитивны по маркеру CD105, в то время как опухоли эпителиальной природы (карциномы) имеют меньший уровень экспрессии маркера или вовсе его лишены. На этом основании было сделано заключение о том, что наличие CD105 на опухолевых клетках можно рассматривать как дополнительный маркер гистогенеза опухолей. В этой же работе были представлены данные, указывающие на положительную корреляцию экспрессии эндоглина клетками опухолей и их способности образовывать колонии при культивировании в мягком агаре.

Результаты изучения экспрессии CD105 на мембранах нормальных и опухолевых клеток различного гистогенеза, полученные в настоящей работе, подтверждают и дополняют ранее опубликованные данные. Наиболее высокой экспрессией эндоглина обладали эндотелиальные клетки линии EA.hy926. Клетки этой линии являются гибридами клеток эндотелия HUVEC и клеток карциномы A549 и сохраняют все основные характеристики эндотелия кровеносных сосудов (Edgell et al., 1983). Нетрансформированные клетки мезенхимного происхождения — ASC и FLECH — также обладали высоким уровнем экспрессии мембранно-ассоциированного эндоглина. Подавляющее большинство линий опухолевых клеток, на которых был выявлен антиген CD105, происходили из нормальных предшественников, которые исходно экспрессировали этот белок. Так, в опухолях, имеющих гемопоэтическое происхождение, эндоглин присутствовал на клетках ранних стадий дифференцировки. Линии глиобластом, обладающие рядом признаков мезенхимного фенотипа, как правило, содержали популяцию CD105⁺-клеток. В двух из трех линий сарком, а также в клетках меланомы MeWo больше половины клеточной популяции были CD105⁺. Из семи исследованных в работе карцином только две линии (HEP-G2 и T24) имели высокий уровень экспрессии эндоглина.

Наряду с мембранным эндоглином в двух линиях опухолей миелоцитарного происхождения (Kg-1 и HL-60), а также в клетках карциномы поджелудочной железы MIA PaCa-2 эндоглин был обнаружен в цитоплазме. Считается, что задержка эндоглина в цитоплазме связана с нарушением его транспорта на клеточную мембрану. Несет ли какую-либо функцию такой эндоглин, остается неизвестным.

В научных публикациях имеется ряд противоречивых данных об экспрессии антигена CD105 клетками разных линий. Так, расходятся сведения относительно присутствия CD105 на клетках опухоли молочной железы MCF-7 (Takahashi et al., 2001a, 2001b; Henry et al., 2011; Tobar et al., 2014). Вероятно, в цитированных работах были использованы разные сублинии этой опухоли. Линия MCF-7 из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург), использованная в настоящей работе, представляла вариант, не экспрессирующий эндоглина. Экспрессия эндоглина в клетках U937 находится в прямой зависимости от стадии их дифференцировки (Blanco et al., 2008). Популяция клеток U937, использованная в настоящей работе, содержала менее 20 % CD105⁺-клеток. Причиной противоречивости данных об экспрессии эндоглина в клеточных линиях может быть также исходная гетерогенность опухолевых клеток, адаптационные изменения, связанные с условиями культивирования, или необратимая селекция определенных популяций в процессе пересевов. В первую очередь это относится к глиобластомам. Так, в линии глиобластомы T98G, которую культивировали в среде, содержащей 5 % ЭТС, популяция клеток CD105⁺ составляла 19.4 %. Увеличение содержания сыворотки в среде культивирования до 10 % приводило к тому, что в процессе пересевов фракция клеток CD105⁺ снижалась до нуля (Киселева и др., 2016). Аналогичная ситуация была описана в той же работе для линии глиобластомы A172.

Мембранно-ассоциированная форма эндоглина может быть представлена в одной из двух изоформ — длинной (L) или короткой (S), которые различаются по длине цитоплазматического участка. Последствия внутриклеточного проведения сигнала с участием S- или L-эндоглина различны. На культурах клеток эндотелия HUVEC, на клетках промоноцитарной линии U937, а также *in situ* на трансгенных мышцах, имеющих избыточную экспрессию S-эндоглина, исследовали значение соотношения экспрессий мРНК, определяющих синтез S- и L-эндоглина (Blanco et al., 2015). При этом было установлено, что усиление экспрессии короткой формы эндоглина по сравнению с длинной происходит в клетках эндотелия при старении, а в клетках макрофагального ряда — в процессе их дифференцировки и старения. Следствием увеличения отношения S-эндоглин/L-эндоглин являлось усиление сигналинга через рецептор ALK5 по сравнению с ALK1 и проявление антиангиогенных свойств эндоглина. У трансгенных мышечей, имеющих избыточную продукцию короткой изоформы эндоглина, отмечали повышение кровяного давления, изменение NO-регуляции гомеостаза и снижение способности сосудов изменять проницаемость под действием TGF- β .

В настоящей работе впервые в опухолевых клетках разного гистогенеза, а также в нетрансформированных клетках исследовали экспрессию двух вариантов сплайсинга мРНК эндоглина, определяющих синтез двух изоформ этого белка. Во всех клеточных линиях преобладала экспрессия L-эндоглина. Были обнаружены линии опухолевых клеток (карцинома поджелудочной железы MIA PaCa-2 и глиобластома R1), в которых экспрессия мРНК S-изоформы эндоглина полностью отсутствовала. Названные клеточные линии могут служить объектами изучения роли S-эндоглина в опухолевых клетках. По соотношению мРНК S- и L-эндоглина значительно различались между собой клетки эндотелия EA.hy926 и мезенхимные стромальные клетки ASC. Различия в соотноше-

нии экспрессии S- или L-эндоглина между клеточными линиями, возможно, указывают на различающиеся функции, выполняемые этим белком в клетках разного происхождения.

Образование клетками sEng является функциональным механизмом, регулирующим клеточный сигналинг с участием ростовых факторов. Сведения об образовании sEng опухолевыми клетками малочисленны и относятся к нескольким опухолям эпителиальной природы (Bernabeu et al., 2009; Tobar et al., 2014). Был поставлен вопрос о том, какое влияние sEng может оказывать на прогрессию и метастазирование опухолей. Группой исследователей (Quintanilla et al., 2015) было сформулировано представление о двойственной роли sEng в опухолевых процессах, согласно которому sEng на ранних стадиях развития опухоли играет роль опухолевого супрессора, тогда как на поздних стадиях он способствует их прогрессии и метастазированию. В этой работе авторы подчеркивали, что эффекты sEng описаны только в отношении клеток эндотелия и нескольких эпителиальных опухолей, тогда как его действие на другие опухоли и на компоненты стромы (фибробласты, мезенхимные стромальные клетки и макрофаги, тучные клетки и нейтрофилы) остаются неизвестными. До сих пор не выработано определенное мнение относительно целесообразности использования уровня циркулирующего sEng плазмы крови в качестве прогностического показателя при ряде солидных опухолей. Принято считать, что этот показатель может отражать интенсивность процесса ангиогенеза в очаге опухолевого роста. При этом не рассматривался возможный вклад самих опухолевых клеток, а также клеток микроокружения в общий пул sEng.

В настоящей работе впервые оценили уровень образования sEng в опухолевых клетках разного гистогенеза и в нетрансформированных стромальных клетках. Наиболее высокой продукцией sEng, как и ожидалось, обладали клетки эндотелия EA.hy926. Среди линий опухолевых клеток наивысшей продукцией sEng отличалась меланома MeWo. В клетках этой меланомы была также обнаружена высокая активность гена *MMP-14*. Клетки, которые могут формировать микроокружение опухолей, а именно мезенхимные стромальные клетки и фибробласты линии FLECH, имели высокоактивный ген *MMP-14*, но при этом уровень шеддинга эндоглина в них был низким. Подобную картину наблюдали для карциномы мочевого пузыря T24 и глиобластомы R1. Протеолитическое отщепление экстраклеточного участка эндоглина является далеко не единственной функцией *MMP-14*. Она также принимает участие в деградации внеклеточного матрикса и ряде других процессов в тканях. Отсутствие корреляции уровня sEng и активности этого фермента не вызывает удивления. В то же время высокий уровень активности гена *MMP-14* в опухолевых клетках может указывать на агрессивность опухолей и их способность к метастазированию, что, в частности, характерно для меланом.

Совокупность полученных результатов указывает на то, что эндоглин экспрессируют многие опухолевые клетки, а также стромальные клетки, формирующие микроокружение опухолей. Основным источником sEng являются клетки эндотелия, тогда как большинство опухолевых клеток, а также стромальные клетки не продуцируют значительного количества sEng. В понимании роли эндоглина в процессе развития и эволюции опухолей остается еще много вопросов. Так, предстоит исследовать функци-

ональную роль эндоглина, содержащегося в цитоплазме ряда опухолевых клеток, и значение соотношения S- и L-эндоглинов в пролиферации опухолей.

Список литературы

- Киселева Л. Н., Карташев А. В., Вартамян Н. Л., Пиневи́ч А. А., Самойлович М. П. 2016. Характеристика клеточных линий A172 и T98G. Цитология. 58 (5): 349—355. (Kiseleva L. N., Kartashev A. V., Vartanyan N. L., Pinevich A. A., Samoilovich M. P. 2016. A172 and T98G cell line characteristics. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 10 (5): 341—348.)
- Киселева Л. Н., Карташев А. В., Вартамян Н. Л., Пиневи́ч А. А., Филатов М. В., Самойлович М. П. 2017. Характеристика новых клеточных линий глиобластом человека. Цитология. 59 (10): 669—675. (Kiseleva L. N., Kartashev A. V., Vartanyan N. L., Pinevich A. A., Filatov M. V., Samoilovich M. P. 2018. Characterization of new human glioblastoma cell lines. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 12 (1): 1—6.)
- Пиневи́ч А. А., Самойлович М. П., Шапкова О. А., Вартамян Н. Л., Польшалов В. Н., Киселева Л. Н., Карташев А. В., Айзенштадт А. А., Климович В. Б. 2014. Характеристика мезенхимных стромальных клеток при раке молочной железы. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2: 84—91. (Pinevich A. A., Samoilovich M. P., Shashkova O. A., Vartanyan N. L., Polysalov V. N., Kiseleva L. N., Kartashev A. V., Aizenshtadt A. A., Klimovich V. B. 2014. Characteristics of mesenchymal stromal cells isolated from patients with breast cancer. Bull. Exp. Biol. Med. 157: 666—672.)
- Пиневи́ч А. А., Терехина Л. А., Самойлович М. П. 2015. Сравнительные характеристики мезенхимальных стромальных клеток, полученных из околочечной и подкожной жировой ткани. Рос. иммунол. журн. 9 (18) (2 (2)): 83—86. (Pinevich A. A., Terekhina L. A., Samoilovich M. P. 2015. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from visceral and subcutaneous adipose tissue. Russ. J. Immunol. 9 (18) (2 (2)): 83—86.)
- Смирнов И. В., Грязева И. В., Самойлович М. П., Терехина Л. А., Пиневи́ч А. А., Крылова А. А., Крутецкая И. Ю., Никольский Н. Н., Климович В. Б. 2015. Панель моноклональных антител против эндоглина человека: получение и характеристика. Цитология. 57 (7): 499—508. (Smirnov I. V., Griazeva I. V., Samoilovich M. P., Terekhina L. A., Pinevich A. A., Krylova A. A., Krutetskaia I. Iu., Nikolsky N. N., Klimovich V. B. 2015. Production and characterization of monoclonal antibodies against human endoglin. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 9 (6) 473—482.)
- Altomonte M., Montagner R., Fonsatti E., Colizzi F., Cattarossi I., Brasoveanu L. I., Nicotra M. R., Cattelan A., Natali P. G., Maio M. 1996. Expression and structural features of endoglin (CD105), a transforming growth factor beta1 and beta3 binding protein, in human melanoma. Br. J. Cancer. 74: 1586—1591.
- Bernabeu C., Lopez-Novoa J. M., Quintanilla M. 2009. The emerging role of TGF- β superfamily coreceptors in cancer. Biochim. Biophys. acta. 1792: 954—973.
- Blanko F. J., Grande M. T., Langa C., Oujo B., Velasco S., Rodrigues-Barbero A., Perez-Gomez E., Quintanilla M., López-Novoa J., Bernabeu C. 2008. S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. Circ. Res. 103: 1383—1392.
- Blanco F. J., Ojeda-Fernandez L., Aristorena M., Gallardo-Vara E., Benguria A., Dopazo A., Langa C., Botella L. M., Bernabeu C. 2015. Genome-wide transcriptional and functional analysis of endoglin isoforms in the human promonocytic cell line U937. J. Cell. Physiol. 230: 947—958.
- Brewer C. A., Setterdahl J. J., Li M. J., Johnston J. M., Mann J. L., McAsey M. E. 2000. Endoglin expression as a measure of microvessel density in cervical cancer. Obstet. Gynecol. 96: 224—228.
- Edgell C. J., McDonald C. C., Graham J. B. 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 80: 3734—3737.
- Erdem O., Taskiran C., Onan M. A., Erdem M., Guner H., Ataglu O. 2006. CD105 expression is an independent predictor of survival in patients with endometrial cancer. Gynecol. Oncol. 103: 1007—1011.
- Fonsatti E., Altomonte M., Nicotra M. R., Natali P. G., Maio M. 2003. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels. Oncogene. 22: 6557—6563.
- Fonsatti E., Maio M. 2004. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. J. Transl. Med. 2: 18.
- Haruta Y., Seon B. K. 1986. Distinct human leukemia-associated cell surface glycoprotein GP160 defined by monoclonal antibody SN6. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 83: 7898—7902.
- Henry L. A., Johnson D. A., Sarrío D., Lee S., Quinlan P. R., Crook T., Thompson A. M., Reis-Filho J. S., Isacke C. M. 2011. Endoglin expression in breast tumor cells suppresses invasion and metastasis and correlates with improved clinical outcome. Oncogene. 30: 1046—1058.
- Kassouf W., Ismail H. R., Aprikian A. G., Chevalier S. 2004. Whole-mount prostate sections reveal differential endoglin expression in stromal, epithelial, and endothelial cells with the development of prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis. 7: 105—110.
- Kumar S., Pan C. C., Bloodworth J. C., Nixon A. B., Theuer C., Hoyt D. G., Lee N. Y. 2014. Antibody-directed coupling of endoglin and MMP-14 is a key mechanism for endoglin shedding and deregulation of TGF- β signaling. Oncogene. 33: 3970—3979.
- Liu Y., Jovanovic B., Pins M., Lee C., Bergan R. C. 2002. Over expression of endoglin in human prostate cancer suppresses cell detachment, migration and invasion. Oncogene. 21: 8272—8281.
- Nolan T., Hands R. E., Bustin S. A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nat. Protoc. 1: 1559—1582.
- Oliveira M. V., Fraga C. A., Barros L. O., Pereira C. S., Santos S. H., Basile J. R., Gomez R. S., Guimarães A. L., De-Paula A. M. 2014. High expression of S100A4 and endoglin is associated with metastatic disease in head and neck squamous cell carcinoma. Clin. Exp. Metastasis. 31: 639—649.
- Oxmann D., Held-Feindt J., Stark A. M., Hattermann K., Yoneda T., Mentlein R. 2008. Endoglin expression in metastatic breast cancer cells enhances their invasive phenotype. Oncogene. 27: 3567—3575.
- Paauwe M., ten Dijke P., Hawinkels L. J. 2013. Endoglin for tumor imaging and targeted cancer therapy. Expert Opin. Ther. Targets. 17: 421—435.
- Pal K., Pletnev A. A., Dutta S. K., Wang E., Zhao R., Baral A., Yadav V. K., Aggarwal S., Krishnaswamy S., Alkharfy K. M., Chowdhury S., Spaller M. R., Mukhopadhyay D. 2014. Inhibition of endoglin-GIPC interaction inhibits pancreatic cancer cell growth. Mol. Cancer Ther. 13: 2264—2275.
- Pérez-Gómez E., Del Castillo G., Santibáñez J.-F., López-Novoa J., Bernabéu C., Quintanilla M. 2010. The role of the TGF- β coreceptor endoglin in cancer. Sci. World J. 10: 2367—2384.
- Postiglione L., Di Domenico G., Caraglia M., Marra M., Giuberti G., Del Vecchio L., Montagnani S., Macri M., Bruno E. M., Abbruzzese A., Rossi G. 2005. Differential expression and cytoplasm/membrane distribution of endoglin (CD105) in human tumour cell lines: implications in the modulation of cell proliferation. Int. J. Oncol. 26: 1193—1201.
- Quackenbush E. J., Letarte M. 1985. Identification of several cell surface proteins of non-T, non-B acute lymphoblastic leukemia by using monoclonal antibodies. J. Immunol. 134: 1276—1285.
- Quintanilla M., del Castillo G., Sánchez-Blanco E., Martín-Villar E., Valbuena-Diez A. C., Langa C., Pérez-Gómez E., Renart J., Bernabéu C. 2015. A suppressor role for soluble endoglin in cancer. Cancer Cell Microenvir. 2: e706.
- Smirnov I. V., Gryazeva I. V., Samoylovich M. P., Terekhina L. A., Pinevich A. A., Shashkova O. S., Krutetskaia I. Y., Sokolov D. I., Selkov S. A., Nikolskiy N. N., Klimovich V. B. 2016. Different pairs of monoclonal antibodies detect variable amounts of soluble endoglin in human blood plasma. Immunochem. Immunopathol. 2: 121.

Takahashi N., Haba A., Matsuno F., Seon B. K. 2001a. Antiangiogenic therapy of established tumors in human skin/severe combined immunodeficiency mouse chimeras by anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies, and synergy between anti-endoglin antibody and cyclophosphamide. *Cancer Res.* 61 : 7846—7854.

Takahashi N., Kawanishi-Tabata R., Haba A., Tabata M., Haruta Y., Tsai H., Seon B. K. 2001b. Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clin. Cancer Res.* 7 : 524—532.

Tobar N., Avalos M. C., Mendez N., Smith P. C., Bernabeu C., Quintanilla M., Martinez J. 2014. Soluble MMP-14 produced by bone marrow-derived stromal cells sheds epithelial endoglin modulating the migratory properties of human breast cancer cells. *Carcinogenesis.* 35 : 1770—1779.

Velasco S., Alvarez-Muñoz P., Pericacho M., Dijke P. T., Bernabéu C., López-Novoa J.M., Rodríguez-Barbero A., 2008. L- and S-endoglin differentially modulate TGF β 1 signaling mediated by ALK1 and ALK5 in L6E9 myoblasts. *J. Cell Sci.* 121 : 913—919.

Wang J. M., Kumar S., Pye D., van Agthoven A. J., Krupinski J., Hunter R. D. 1993. A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues. *Int. J. Cancer.* 54 : 363—370.

Zakrzewski P. K., Cygankiewicz A. I., Mokrosiński J., Nowacka-Zawisza M., Semczuk A., Rechberger T., Krajewska W. M. 2011. Expression of endoglin in primary endometrial cancer. *Oncology.* 81 : 243—250.

Zijlmans H. J., Fleuren G. J., Hazelbag S., Sier C. F., Dreef E. J., Kenter G. G., Gorter A. 2009. Expression of endoglin (CD105) in cervical cancer. *Br. J. Cancer.* 100 : 1617—1626.

Поступила 13 I 2018

ENDOGLIN EXPRESSION BY UNTRANSFORMED AND TUMOR CELLS OF DIFFERENT HISTOGENESIS

M. P. Samoilovich,^{1, 2, *} A. A. Pinevich,^{1, 2} N. L. Vartanyan,¹ I. V. Smirnov,¹
I. Yu. Krutetskaya,¹ A. Yu. Stolbovaya,¹ O. A. Shashkova,¹ I. V. Gryazeva,¹
M. A. Berlina,¹ T. D. Smirnova,³ V. B. Klimovich¹

¹ Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies named after A. M. Granov, St. Petersburg, 197758,

² St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034, and

³ Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376;

* e-mail: mpsamoylovich@gmail.com

Transmembrane protein endoglin (CD105) is a component of a receptor complex for TGF- β family growth factors. It is expressed mainly by the endothelial cells, mesenchymal stromal cells and early hematopoietic precursors. CD105 density increases on the membranes of proliferating endothelium. Soluble endoglin (sEng) is formed by a cleavage of extracellular fragment of the protein. Its level in blood is considered as an indicator of angiogenesis during development of some tumors. The contribution of tumor cells in sEng pool remains unknown. The expression of CD105, production of sEng, as well as the level of two splicing variants of endoglin gene and *MMP-14* gene activity were investigated using the collection of 43 cultures of untransformed and tumor cells of different histogenesis. More than half of tumor cell lines and untransformed stromal cells contained cell populations bearing membrane endoglin. Cytoplasmic endoglin with unknown function was found in the cells of three tumor lines. In all cell cultures mRNA expression of L-endoglin prevailed over the expression of S-endoglin. Formation of sEng has been investigated in stromal and tumor cells for the first time. It was estimated that endothelial cells represent the main source of sEng, whereas the majority of CD105⁺ tumor cells and untransformed stromal cells showed low sEng production. Among tumor cell lines, the highest concentration of sEng was found in MeWo melanoma cells, which at the same time had the highest activity of *MMP-14* gene.

Key words: cell lines, mesenchymal stromal cells, tumor cells, endothelium, endoglin, L-endoglin, S-endoglin, CD105, *MMP-14* gene.