

DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-1-32-40



Влияние гипоксии на секретом клеток мультиформной глиобластомы человека

Т.И. Кушнир, Н.Е. Арноцкая, И.А. Кудрявцев, А.А. Митрофанов, А.Х. Бекашев, В.Е. Шевченко*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24***Контакты:** Валерий Евгеньевич Шевченко vshev2015@yandex.ru

Введение. Мультиформная глиобластома (МГБ) развивается на фоне гипоксической микросреды, играющей важную роль в патогенезе заболевания и тесно связанной с ростом и развитием опухоли и плохим прогнозом. Гипоксия (ГС) повышает резистентность опухолевых клеток (ОК) к лучевой терапии и химиотерапии, способствует появлению агрессивного фенотипа ОК, приводящего к рецидиву заболевания. Молекулярные механизмы действия ГС на секретом клеток МГБ, участвующий в формировании микроокружения опухоли, остается не изученным. В настоящее время также не установлены маркеры агрессивного гипоксического фенотипа опухолевых клеток.

Цель исследования – изучение молекулярных механизмов действия гипоксии на секретом клеток U251 МГБ. **Материалы и методы:** протеомная масс-спектрометрия высокого разрешения, клеточные технологии.

Результаты. В секретом двух типов клеток МГБ (контроля и опыта) в целом идентифицированы 1432 белка. После действия гипоксии зарегистрированы статистически значимые изменения в экспрессии 390 белков. Повышение экспрессии более чем на два порядка наблюдали у 11 протеинов. Идентифицированы внутриклеточные сигнальные пути, ответственные за действие гипоксии на клетки U251 МГБ.

Заключение. Гипоксия оказывала заметное влияние на протеомный состав секретом клеток МГБ. В качестве потенциальных маркеров гипоксического фенотипа МГБ предложены 5 гиперэкспрессированных белков секретом: S100A6, HEY1, ZIP3, S100A4, ZEB2, для которых ранее доказано участие в патогенезе мультиформной глиобластомы.

Ключевые слова: мультиформная глиобластома, гипоксия, протеом, секретом, прогностические маркеры, масс-спектрометрия

Для цитирования: Кушнир Т.И., Арноцкая Н.Е., Кудрявцев И.А., Митрофанов А.А., Бекашев А.Х., Шевченко В.Е. Влияние гипоксии на секретом клеток мультиформной глиобластомы человека. Успехи молекулярной онкологии 2021;8(1):32–40. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-1-32-40.

The effect of hypoxia on the secretome of human glioblastoma multiforme cells

*T.I. Kushnir, N.E. Arnotskaya, I.A. Kudryavtsev, A.A. Mitrofanov, A.K. Bekyashev, V.E. Shevchenko**N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia***Contacts:** Valeriy Evgenievich Shevchenko vshev2015@yandex.ru

Background. Glioblastoma multiforme (GBM) develops in the hypoxic microenvironment, which plays an important role in the pathogenesis of the disease and is closely associated with tumor growth, development and poor prognosis. Hypoxia increases the resistance of tumor cells (TC) to radiation therapy and chemotherapy, promotes the appearance of an aggressive TC phenotype, leading to the disease recurrence. The molecular mechanism of hypoxic action on the secretome of GBM cells, which is involved in the formation of the tumor microenvironment, remains unclear. Also, markers of the aggressive hypoxia-associated phenotype of tumor cells have not been established.

The purpose of research – to study the molecular mechanisms of the hypoxia-associated effect on the secretome of the U251 GBM cells.

Materials and method. High resolution proteomic mass spectrometry, cell technologies.

Results. A total of 1432 proteins were identified in the secretomes of two types of GBM cells (control and experiment). After the action of hypoxia, statistically significant changes in the expression of 390 proteins were registered. 11 proteins showed increase in expression over two orders of magnitude. The intracellular signaling pathways which are responsible for the hypoxia-associated effects on the U251 GMB cells have been identified.

Conclusions. Hypoxia significantly affected the proteomic composition of the GBM cells secretome. Five overexpressed secretome proteins, S100A6, HEY1, ZIP3, S100A4, ZEB2, have been proposed as potential markers of the hypoxia-associated phenotype of GBM, for which participation in the pathogenesis of glioblastoma multiforme has been previously showed.

Key words: glioblastoma multiforme, hypoxia, proteome, secretome, prognostic markers, mass spectrometry

For citation: Kushnir T.I., Arnotskaya N.E., Kudryavtsev I.A., Mitrofanov A.A., Bekyashev A.K., Shevchenko V.E. The effect of hypoxia on the secretome of human glioblastoma multiforme cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2021;8(1):32–40. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-1-32-40.

ВВЕДЕНИЕ

Мультиформная глиобластома (МГБ), или астроцитомы IV степени злокачественности, – наиболее распространенная, инвазивная, первичная, глиальная опухоль головного мозга человека. МГБ развивается на фоне сильной гипоксии (ГС) ($pO_2 = 0,5–2,5\%$), играющей важную роль в патогенезе заболевания [1, 2]. ГС – результат высокой пролиферативной и метаболической активности злокачественных клеток [3]. Ранее показано, что прогрессирование опухоли обусловлено гипоксической передачей сигналов [4]. Инвазия опухоли одна из основных причин смерти больных МГБ. Низкая оксигенация опухоли модулирует взаимодействие стромальных клеток в микроокружении опухоли, способствует выживанию и распространению ОК в здоровую паренхиму головного мозга. ГС приводит к снижению чувствительности клеток МГБ к облучению и цитотоксической активности многих видов химиотерапии [1, 5].

Поскольку в глиомах часто присутствуют участки с различными степенями злокачественности в опухоли, важное значение приобретает изучение особенностей, закономерностей и механизмов образования агрессивного фенотипа клеток МГБ в условиях ГС. Актуальной становится идентификация молекулярных детерминант фенотипической трансформации линий клеток МГБ человека при действии ГС.

В настоящее время считается, что не только протеом ОК, но и их секретом имеет важное значение, представляя собой микросреду опухоли, играющую ключевую роль в формировании злокачественного фенотипа, а также в процессах ангиогенеза и инвазии. Изучение в опытах *in vitro* секретомы линий клеток МГБ даст возможность оценить глубину изменений их фенотипа под влиянием фактора клональной селекции – ГС, чтобы использовать эти данные в клинической онкологии.

В данной работе мы исследовали эффект ГС на секретомы линий клеток U251 МГБ человека, культивируемых в условиях нормоксии (НС) и низкой оксигенации (1 % O_2). ГС существенно влияла на секретомы опухолевых клеток. В частности, ее действие повышало более чем на два порядка уровни 11 белков секретомы, для которых участие в канцерогенезе отмечено во многих исследованиях. Эти гиперэкспрессированные белки могут являться потенциальными маркерами ги-

поксического фенотипа (ГФ) клеток МГБ и использоваться для его обнаружения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение секретомы клеток U-251 МГБ. Клетки линии U-251 культивировали при температуре +37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO_2 в среде DMEM/F12 (Gibco, Life Technologies, Россия) с низким содержанием глюкозы, глутамином, добавлением 10 % бычьего сывороточного альбумина, пенициллина (100 ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) в общем объеме 15 мл в пластиковых флаконах для культур клеток (75 см²) (Corning Costar, США).

При достижении 70 % монослоя (после 48 ч роста) клетки двукратно осторожно отмывали бессывороточной средой, затем культивировали в бессывороточной среде в течение 24 ч при температуре +37 °С в различных условиях:

- 1) контрольный образец клеток инкубировали при 20 % содержании O_2 (в нормоксических условиях);
- 2) опытный образец клеток инкубировали при 1 % содержании O_2 (в гипоксических условиях).

Контрольные и опытные клетки выращивали в трех экземплярах, независимо обрабатывали и анализировали. После инкубации отбирали кондиционированную среду (КС) (по 45 мл), центрифугировали на оборудовании Biosan LMC-3000 (Biosan, Латвия) при 1500 об/мин 10 мин для удаления интактных клеток и клеточного дебриса. Супернатант пропускали через 0,22 мкм фильтр и хранили при –80 °С для дальнейшего использования. Число мертвых клеток оценивали окрашиванием культуры клеток трипановым синим, а их относительное количество – по соотношению уровней лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (показателя гибели клеток): КС(ГС)/КС(НС).

Подготовка образцов для масс-спектрометрии. Секретомы опухолевых клеток подвергали ультрафильтрации для удаления низкомолекулярных соединений описанным методом [6]. После ферментативного расщепления (трипсинолиза) образцы концентрировали при +30 °С в центрифужном концентраторе Labconco CentriVar (Labconco, США) для полного удаления бикарбоната аммония.

Продукты трипсинолиза секретомы ОК (100 мкг) растворяли в 50 мкл фазы А (20 мМ NH_4OH , pH 10) и фракционировали на колонке Zorbax 300 Extend-C18

(2,1 × 500 мм; 3,5 мкм) (Agilent, США) на высокоэффективном жидкостном хроматографе (ВЭЖХ) Agilent 1100 (Agilent, США), оборудованном коллектором фракций и УФ-детектором. Объем введенной пробы составлял 20 мкл, температура колонки – 25 °С, детектирование по УФ-поглощению при длине волны 214, 254, 280 нм. Подвижная фаза состояла из двух фаз: А (20 мМ NH₄OH, pH 10) и Б (20 % фазы А плюс 80 % ацетонитрила). Колонку уравнивали фазой А в течение 30 мин перед вводом образца. Для фазы Б градиент подвижной фазы был установлен следующим образом (при скорости потока 300 мкл/мин): а) от 0 до 5 мин: 0 %; б) от 5 до 35 мин – 0–35 %; в) от 35 до 45 мин – 35–100 %; г) от 45 до 60 мин – 100 %; д) от 60 до 70 мин – 100–0 %. Всего были собраны 24 фракции от 0 до 50 мин с интервалами 1,5 и 3 мин. Фракции упаривали досуха при 30 °С в центрифужном испарителе CentriVap (Labconco, США) и повторно разбавляли 100 мкл 0,1 % муравьиной кислоты для масс-спектрометрического анализа.

Масс-спектрометрический анализ. Анализ пептидов, образованных после трипсинолиза белков секрета ОК, проводили с использованием нано-ВЭЖХ Dionex Ultimate 3000 (Dionex, США) и масс-спектрометра LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Inc., США) с источником ионизации NanoSpray (Thermo Fisher Scientific, Inc., США) [6]. Для обработки масс-спектрометрических данных использовали программное обеспечение MaxQuant (v1.6.1.0; Biochemistry Computational Systems, Biochemistry Max Planck, Martinsried, Германия). Таблицу полученных белков обрабатывали в программе Perseus v1.5.1.6 для аннотирования и удаления белков-контаминантов и ложноположительных идентификаций, а также для определения статистической значимости различий в уровнях белков, полученных методом label-free (без метки). Значимыми считали различия при уровне достоверности $p < 0,05$ для парного t-критерия Стьюдента.

Аннотирование биологических, молекулярных функций и сигнальных путей проводили с помощью открытых баз данных PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed), PANTHER (www.pantherdb.org), GeneOntology (www.geneontology.org/), Swiss-Prot (www.uniprot.org/uniprot), KEGG (www.genome.jp/kegg/), DAVID (david.ncifcrf.gov/home.jsp). Анализ данных The Cancer Genome Atlas (TCGA) (200 больших МГБ) выполняли с помощью программы GBM-BioDP с использованием модели пропорциональных интенсивностей Кокса.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При получении высококачественного секрета ОК предварительно изучался эффект ГС на выживаемость линии клеток U251 МГБ. Перед проведением опыта количество мертвых клеток в контрольном и опытно образцах составляло ~3 %. После инкубации ОК в нормоксических условиях в течение 24 ч число мертвых клеток увеличилось до ~5 %, под дейст-

вием ГС – до ~8 %. Соотношение уровней ЛДГ(ГС)/ЛДГ(НС) составило 1,3.

Мы использовали метод label-free для количественного нано-ВЭЖХ – МС/МС (тандемная масс-спектрометрия) анализа секретомов линии клеток U251 МГБ человека в условиях НС и ГС (1 % O₂) в течение 24 ч. Анализом триптических пептидов по их 11 059 спектрам МС/МС с помощью программного пакета MaxQuant были просеквенированы 1342 протеина по 3000 (2469 уникальным) пептидам при сравнении с данными базы SwissProt_human и ложным уровнем обнаружения (a false discovery rate) 1 % для тройных повторов двух видов образцов. Из них 1133 белка идентифицировали по 2748 (2225 уникальным) пептидам в секретах контрольных клеток U251 и 1025 белков – по 2614 (2098 уникальным) пептидам в секретах клеток U251 после действия ГС. Для всех линий клеток ~32 % белков идентифицировали по 2 и более пептидам. Диапазон молекулярных масс протеинов изменялся от 0,96 до 2993 кДа, из них 524 имели молекулярный вес до 30 кДа, 568 – от 30 до 100 кДа, 206 – от 100 до 300 кДа, 26 – от 300 до 500 кДа, 18 – выше 500 кДа. Процент покрытия анализируемых белков варьировался от 0,2 до 100 %, из них: 1153 белка – с покрытием до 20 %, 155 – от 20 до 40 %, 21 – от 40 до 60 % и 13 – от 60 до 100 %. Коэффициент корреляции Пирсона для данных по образцам клеток U251 до и после действия ГС изменялся от 0,904 до 0,952.

Идентифицированные протеины показали достаточно высокий процент перекрытия для двух клеточных популяций. Восемьсот шестнадцать из 1342 (61 %) протеинов детектировались во всех клеточных секретах, 317 протеинов – только в секрете клеток U251, культивируемых в условиях НС, и 209 протеинов были уникальными для секрета клеток U251 после действия ГС.

Статистически значимые изменения в экспрессии ($p < 0,05$) после действия ГС зарегистрировали для 390 белков. Триста сорок один протеин был дифференциально экспрессированным белком (ДЭБ) и изменял экспрессию более чем в 2 раза, 151 – увеличивал, а 190 – уменьшали. Повышение экспрессии более чем на два порядка наблюдали у 11 протеинов.

Динамический диапазон (определяемый порогом чувствительности масс-спектрометра и линейной зависимостью его сигнала от концентрации анализируемого объекта) для идентифицированных белков составляет 6 порядков (от $4,1 \cdot 10^8$ до 363), что позволяет выявить низкокопийные белки (протеины с низкими уровнями концентрации в секрете), такие как кофиллин-2, MIF (Macrophage migration inhibitory factor) и др. Также идентифицированы специфические маркеры мезенхимального субтипа (CD44, интегрин β -1) МГБ.

Для лучшего понимания биологических процессов и путей, включенных в гипоксия-индуцированные отклики, мы провели развернутый биоинформатический анализ данных картирования белков секретомов



Рис. 1. Биологические процессы с участием дифференциально экспрессированных белков секрета клеток U251 мультиформной глиобластомы, культивируемых в условиях гипоксии и нормоксии
Fig. 1. Biological processes involving the secretome differentially expressed proteins of the U251 glioblastoma multiforme cells cultured at hypoxia and normoxia



Рис. 2. Молекулярные функции дифференциально экспрессированных белков секрета клеток U251 мультиформной глиобластомы, культивируемых в условиях гипоксии и нормоксии
Fig. 2. Differentially expressed proteins molecular functions of the secretome of the U251 glioblastoma multiforme cells cultured at hypoxia and normoxia

двух типов клеток с использованием KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) и биологических процессов GO (Gene Ontology). В дальнейшем включали в анализ каждой из групп сравнения только ДЭБ.

Каждый идентифицированный белок, удовлетворяющий вышеназванным требованиям, классифицировался в соответствии с его биологической ролью в клетке, молекулярной функцией и функциональным классом. Основная часть ДЭБ участвовала в метаболических (GO:0008152) (28,1 %) и клеточных (GO:0009987) (28,8 %) процессах, а также в процессах организации клеточных компонентов, биогенезе (GO:0071840) (10,7 %) и локализации (GO:0051179) (9,4 %) (рис. 1).

Большая часть ДЭБ проявляла каталитическую (GO:0003824) (39,9 %), связывающую (GO:0005488) (35,4 %), структурно-молекулярную (GO:0005198) (13,4 %), транспортную (GO:0005215) (6,3 %) активность (рис. 2). Основная часть ДЭБ представлена нуклеопро-теидами (PC00171) (11,9 %), гидролазами (PC00121) (10,9 %), модуляторами энзимов (PC00095) (9,5 %), рецепторами (PC00197) (7,5 %), сигнальными молекулами (PC00207) (6,5 %).

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ выживаемости линии клеток U251 МГБ при ГС и НС в течение 24 ч показал, что ГС в этих условиях оказывала достаточно слабый эффект. Число мертвых клеток в опыте не превышало 8 %, а в контроле – 5 %, что в целом не мешало получению высококачественного секрета опухолевых клеток и не сказывалось заметно на его качественном и количественном составе. Особенно это касалось ДЭБ, экспрессия которых менялась более чем в 2 раза. Несомненно, что небольшая часть белков секрета связана с гибелью клеток. Тем не менее ГС оказывала значительное влияние на внутриклеточные процессы, что находило свое отражение в протеомном составе секрета линии клеток U251 МГБ.

Нами обнаружено достаточно большое количество ДЭБ, 16 % идентифицированных протеинов были уникальными для ОК после ее действия. Происходили изменения с участием 77 % ДЭБ в клеточных, метаболических процессах, а также в процессах организации клеточных компонентов и биогенезе. Большая часть ДЭБ (89 %) проявляла каталитическую, связывающую и структурно-молекулярную активность. Появление в секрете 13,4 % ДЭБ со структурно-молекулярной активностью можно объяснить тем, что основную часть этих протеинов составляли два высокоэкспрессированных коллагена (COL5A2 и COL1A2), участвующие в построении внеклеточного матрикса. Оба белка вырабатываются и секретируются клетками U251 МГБ. После действия ГС отмечали значительное обогащение сигнальных путей в клетках U251 МГБ, связанных с клеточным дыханием, инвазией, протеасомной активностью, презентацией антигенов (табл. 1).

Таблица 1. Анализ обогащения сигнальных путей после действия гипоксии на линию клеток U251 мультиформной глиобластомы

Table 1. Enrichment analysis of signaling pathways after exposure to hypoxia on the U251 glioblastoma multiforme cells

Сигнальный каскад Signal cascade	Дифференциально экспрессированный ген Differentially expressed gene	p*
Гликолиз/глюконеогенез Glycolysis/gluconeogenesis	AKR1A1; ALDH2; ALDOC; GAPDH; LDHA; LDHAL6B; PGAM1; PGM1; TPI1	2,5E-4
Фокальная адгезия Focal adhesion	ACTN1; COL1A1; COL1A2; COL5A2; COL6A1; FLNA; FLNC; FN1; ITGB5; LAMC1; MYL12A; MYL12B; MYL9; PTK2; RAPIA; RAPIB	5,0E-4
Регуляция актинового цитоскелета Regulation of the actin cytoskeleton	ACTN1; APC; ARPC2; BAIAP2; CFL1; CFL2; CHRM3; F2; FGF7; FN1; ITGB5; MYL12A; MYL12B; MYL9; PTK2; TMSB4X	1,0E-3
Протеасомы Proteasomes	PSMA1; PSMA3; PSMA5; PSMA6; PSMB4; PSMC5; PSME1	1,9E-3
Процессирование и презентация антигена Antigen processing and presentation	CIITA; HLA-DPB1; HLA-DRB1; HSP90AB1; HSPA1L; HSPA5; HSPA8; KIR2DL3; PSME1	2,2E-3
Взаимодействие внеклеточного матрикса с рецептором Interaction of the extracellular matrix with the receptor	COL1A1; COL1A2; COL5A2; COL5A2; COL5A2; DAG1; FN1; HMMR; ITGB5; LAMC1	2,4E-3

* Модифицированное точное p-значение критерия Фишера для анализа обогащения генов с диапазоном значений от 0 до 1. Точное p-значение Фишера, равное 0, представляет собой идеальное обогащение. Обычно значение p равно или меньше 0,05, чтобы считаться сильно обогащенным в категориях аннотаций.

* Modified exact p-value of the Fisher criterion for gene enrichment analysis with a range of values from 0 to 1. Exact p-value of the Fisher criterion of 0 represents ideal enrichment. Usually p-value is equal to or less than 0.05 to be considered highly enriched in annotation categories.

Таблица 2. Дифференциально экспрессированные белки секрета, уровни которых увеличились на 2 порядка при действии гипоксии на клетки U251 мультиформной глиобластомы

Table 2. The levels of secretome differentially expressed proteins which increased over 2 orders of magnitude under the action of hypoxia on the U251 glioblastoma multiforme cells

Индекс гена Gene index	Название белка Protein name	Молекулярный вес, кДа Molecular weight, kDa	Гипоксия/нормоксия Hypoxia/normoxia
S100A6	S100 кальций-связывающий белок A6 S100 calcium-binding protein A6	9,6810	509
HEY1	HESR белок-1, связанный с YRPW-мотивом HESR protein-1 associated with the YRPW motif	32,6380	293
ZIP3	Транспортер цинка ZIP3 Zinc-regulated transporter 3	11,2050	271
BAG6	Белок, богатый пролином BAG6 Large proline-rich protein BAG6	21,2240	221
ATP11A	Фосфолипид-транспортирующие аденозинтрифосфатазы 11A Adenosine triphosphatases phospholipid transporting 11A	10,5700	203
S100A4	S100 кальций-связывающий белок A4 S100 calcium-binding protein A4	11,7280	169
BAZ2B	Бром-домен, ассоциированный с доменом «цинкового пальца» 2B Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B	240,4600	159
ZNF350	Белок «цинковый палец» 350 Zinc finger protein 350	60,0110	152
PSMA1	Протеасомная субъединица альфа-1 Proteasome subunit alpha type-1	26,5050	145
SORCS3	VPS10-доменный рецептор SorCS3 VPS10 domain-containing receptor SorCS3	135,7800	113
ZEB2	E-бокс-связывающий белок гомеобокс 2 «цинкового пальца» Zinc finger E-box binding homeobox 2	6,4847	90

В целом зарегистрированы изменения в 45 сигнальных каскадах.

ГС повышала экспрессию 151 ДЭБ и более чем на два порядка 11 белков (табл. 2), для которых участие в канцерогенезе отмечено во многих исследованиях. Согласно литературным источникам, BAG6, ATP11A, BAZ2B, ZNF350, PSMA1, SORCS3 участвуют в патогенезе ряда злокачественных новообразований (табл. 3). Для составления табл. 3 использовалась база данных The Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org) с включенным в нее патологическим атласом с данными по опухолевым заболеваниям с повышенной экспрессией интересующих нас белков.

Роль перечисленных 6 белков в патогенезе МГБ и процессах, связанных с ГС, на текущий момент не известна. Впервые полученные нами данные о гиперэкспрессии секретируемых белков BAG6, ATP11A, BAZ2B, ZNF350, PSMA1, SORCS3 при действии ГС на клетки линии U251 МГБ могут быть полезны и ис-

Таблица 3. Злокачественные новообразования, в патогенезе которых участвует ряд дифференциально экспрессированных белков

Table 3. Malignant neoplasms in the pathogenesis of which a number of differentially expressed proteins are involved

Индекс гена Gene index	Злокачественное новообразование Malignant neoplasm
BAG6	Рак щитовидной железы, головы и шеи, яичка, предстательной железы, молочной железы, яичников, толстой кишки, карциноид, меланома Cancer of the thyroid gland, head and neck, testicle, prostate, breast, ovary, colon, carcinoid, melanoma
ATP11A	Рак щитовидной железы, поджелудочной железы, головы и шеи, мочевого пузыря, яичка, толстой кишки, меланома, карциноид Cancer of the thyroid gland, pancreas, head and neck, bladder, testicle, colon, melanoma, carcinoid
BAZ2B	Рак щитовидной железы, легких, печени, поджелудочной железы, головы и шеи, почки, мочевого пузыря, яичка, предстательной железы, эндометрия, молочной железы, шейки матки, толстой кишки, лимфома Cancer of the thyroid gland, lungs, liver, pancreas, head and neck, kidney, bladder, testicle, prostate, endometrium, breast, cervix, colon, lymphoma
ZNF350	Рак головы и шеи, предстательной железы, шейки матки Cancer of the head and neck, prostate, cervix
PSMA1	Гепатоцеллюлярная карцинома, рак мочевого пузыря, желудка, шейки матки, яичка, щитовидной железы, меланома Hepatocellular carcinoma, cancer of the bladder, stomach, cervix, testicle, thyroid gland, melanoma
SORCS3	Рак почки Kidney cancer

пользованы в других исследованиях для поиска потенциальных терапевтических мишеней и маркеров ГФ МГБ.

При поиске потенциальных маркеров ГФ МГБ основное внимание уделялось 5 гиперэкспрессированным белкам: S100A6, HEY1, ZIP3, S100A4, ZEB2, для которых доказано участие в патогенезе МГБ. Согласно базам данных по изучению протеома человека (Human Proteome Project), протеомному составу ликвора и экзосомам (ExoCarta), все эти белки могут анализироваться в биологических жидкостях больных МГБ, потенциально использоваться для детектирования ГФ МГБ и прослеживания эффективности терапии заболевания.

Для оценки роли генов, кодирующих группу ДЭБ (S100A6, HEY1, ZIP3, S100A4, ZEB2), в выживаемости больных МГБ были построены кривые Каплана – Мейера для 4 различных субтипов МГБ на основе мультигенного прогностического индекса отношения рисков – отношения риска события в определенный момент времени t в одной и другой группах (рис. 3). Показатель относится к методам оценки выживаемости и оценивается при проведении регрессионного анализа. Отношение рисков связано с вероятностью того, что событие, не произошедшее к определенному моменту времени, случится в следующий интервал времени. Вероятность того, что событие в одной группе наступит раньше, чем в другой, может быть рассчитана на основании показателя HR по формуле $p = HR/(1 + HR)$.

Анализ данных TCGA (200 больных МГБ), выполненный с помощью программы GBM-BioDP с использованием модели пропорциональных интенсивностей Кокса, показал, что снижение в опухоли экспрессии группы матричных рибонуклеиновых кислот (мРНК), отвечающих перечисленным выше белкам, приводит к увеличению выживаемости пациентов с МГБ. Наибольший эффект наблюдался для больных с пронеуральным и нейральным субтипами МГБ.

Наиболее изученным белком этой группы является S100A4. Как видно из табл. 2, уровень S100A4 в секрете возрастал в 169 раз после действия ГС на клетки U251. Повышенная экспрессия S100A4 в опухолевой ткани наблюдалась при многих онкозаболеваниях [7]. S100A4 является прогностическим показателем выживаемости пациентов с глиомой и может использоваться в качестве маркера при МГБ [7]. S100A4 связан с мезенхимальным фенотипом МГБ и играет важную роль в пронеурально-мезенхимальном переходе (ПМП) [8]. Мезенхимальный субтип МГБ характеризуется наибольшей инвазивностью и резистентностью к терапии [9]. Нами показано, что уровень экспрессии S100A4 положительно ассоциировался с маркерами мезенхимального субтипа глиобластомы CD44 и FN1 (в условиях ГС экспрессия увеличивалась в 6,8 и 1,22 раза соответственно). Как полагают, S100A4 действует через систему MMP/TIMP (матриксные металлопротеиназы/ингибиторы металлопротеиназы) при индукции

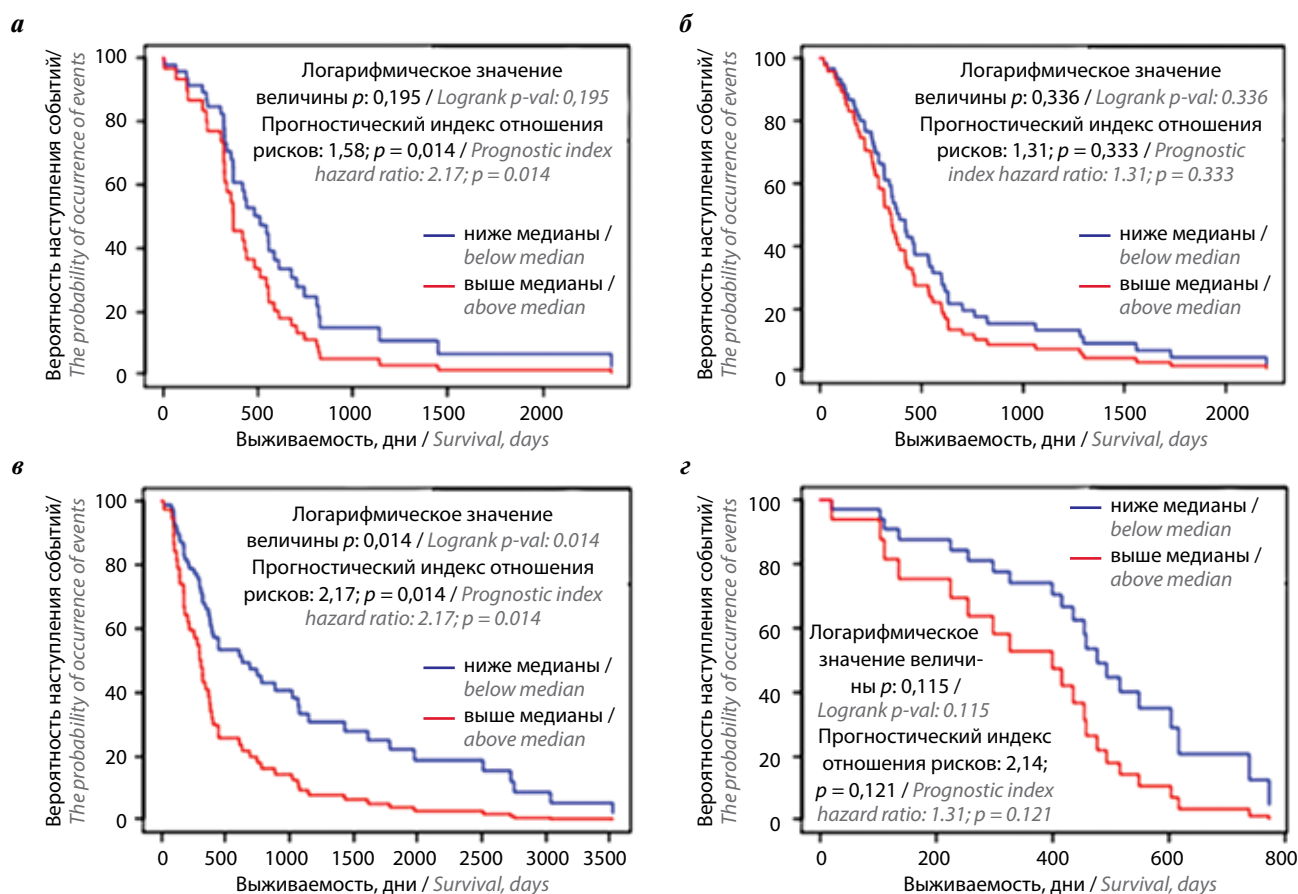


Рис. 3. Анализ выживаемости 200 больных с классическим (а), мезенхемальным (б), пронеуральным (в) и нейральным (г) субтипами мультиформной глиобластомы на основе мультигенного прогностического индекса отношения рисков с использованием данных по матричным рибонуклеиновым кислотам из базы «Атласа ракового генома»

Fig. 3. Survival analysis of 200 patients with with classical (a), mesenchymal (б), proneural (в), and neural (г) subtypes of glioblastoma multiforme based on the multigenic prognostic index Hazard ratio using matrix ribonucleic acids data from The cancer genome atlas database

инвазии и ангиогенеза. S100A4 сверхэкспрессирован в инвазивных клеточных линиях глиомы одновременно со снижением экспрессии TIMP2 (0,51 раза при ГС). Это указывает на тесную связь S100A4 с системой ММР (MMP19 – в 3,57 раза выше в условиях ГС) при инициации инвазии.

Ранее показано, что экспрессия белка S100A4 контролируется сигнальным путем Wnt/ β -катенин [7]. Нами установлена прямая связь S100A4 с WNT/ β -катенин каскадом (увеличение экспрессии CTNNB1 при ГС в 6,1 раза) и P53/статин сигнальным каскадом (увеличение экспрессии STMN1 в 2,45 и STMN2 в 53,22 раза). S100A4 является прямой мишенью β -катенин/TCF (transcription factor) и считается маркером ПМП, которому способствует его повышенная экспрессия [8].

Таким образом, в патогенезе МГБ S100A4 играет важную роль: является маркером мезенхимального субтипа опухолевых клеток и способствует метастазированию опухоли, участвует в регуляции клеточного цикла, клеточной пролиферации, подвижности, инвазии и инициирует процесс ангиогенеза.

Как показано в табл. 2, уровень белка S100A6 в секрете ОК возрастал в 509 раз после действия ГС на клетки U251. При ряде новообразований S100A6

сверхэкспрессирован [7, 10] и считается диагностическим маркером или прогностическим фактором при раке поджелудочной железы, желудка, предстательной железы, меланоме и гепатоцеллюлярной карциноме [11].

Белок S100A6 взаимодействует с Casp9/SIP (компонентом убиквитинлигазы) и таким образом может регулировать деградацию β -катенина. S100A6 ингибирует Casp9/SIP, стимулируя клеточную пролиферацию и миграцию, опухолегенез и ПМП посредством ингибирования деградации β -катенина [11].

Можно сделать вывод о том, что S100A6 играет важную роль в патогенезе глиобластомы, участвуя в регуляции нескольких клеточных функций, таких как пролиферация, апоптоз клеток и инвазия.

Согласно данным табл. 2, уровень белка HEY1 в секрете ОК возрастал в 293 раза после действия ГС на клетки U251. HEY1 участвует в патогенезе МГБ, ингибируя транскрипцию пронеуральных транскрипционных факторов MASH1, MATH3, нейрогена. Измененная активность сигнального пути NOTCH играет существенную роль в формировании опухолей головного мозга, увеличивая экспрессию HEY1 [12]. Повышенная активность фактора транскрипции E2F также увеличивает экспрессию HEY1 и усиливает пролиферацию

клеток [12]. Сигнальный путь TGF- β /SMAD регулирует экспрессию HEY1 через канонический NOTCH или независимым от NOTCH способом. При активации TGF- β 1 инициирование HEY1 происходит через связывание SMAD 3/SMAD 4 с промоторами HEY1 в положениях повторов связывающих элементов SMAD [13]. Как и в случае с каскадом NOTCH, сигнальный каскад TGF- β /SMAD часто активируется в опухолях и способствует их прогрессированию [13]. BMP9-белок активирует SMAD 1/5/8 и непосредственно стимулирует экспрессию HEY1 через неканонический путь передачи сигналов NOTCH [13].

Таким образом, HEY1 играет значительную роль в пролиферации и инвазии клеток МГБ.

Экспрессия ZEB2 увеличилась в 90 раз (см. табл. 2). Уровень ZEB2 положительно коррелирует с прогрессией и прогнозом многих видов рака, включая рак молочной железы, почек, поджелудочной железы и яичников. ZEB2 является хорошо известным активатором ПМП. Показано, что в клеточных линиях глиомы, как ZEB1, так и ZEB2, способствуют пролиферации и инвазии опухолевых клеток [14]. Многие молекулы, в том числе ZEB2, N-кадгерин, TWIST и SNAIL, активируют ПМП, тогда как E-кадгерин ингибирует процесс ПМП. ZEB1 может подавлять транскрипцию E-кадгерина и, следовательно, способствовать ПМП. Сигнальный путь ZEB регулирует пролиферацию, миграцию, инвазию, апоптоз клеток и обуславливает хеморезистентность глиобластомы [14].

Как видно из табл. 2, уровень белка ZIP3 в секрете ОК увеличивался в 271 раз после действия ГС

на клетки МГБ. Ген ZIP3 активно взаимодействует с несколькими генами, играющими важную роль в росте клеток и ангиогенезе, такими как MMP-9, VEGF-A, PDGF-A, IL-6, IL-8 и IGFBP-2. Они опосредуют эффект ZIP3 на опухолевый рост и метастазирование глиомы и обратно коррелируют с выживаемостью пациентов. Экспрессия ZIP3 достоверно коррелирует со всеми этими генами, указывая на то, что ZIP3 может участвовать во множестве сигнальных путей и потенциально регулировать прогрессию опухолевого процесса [15].

Полученные нами данные о действии ГС на экспрессию белков S100A6, HEY1, ZIP3, S100A4, ZEB2, по нашему мнению, указывают на то, что они могут являться потенциальными прогностическими маркерами ГФ ОК. Присутствие этих протеинов в экзосомах открывает возможность использования метода жидкой биопсии для оценки эффективности терапии МГБ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения изучены молекулярные механизмы действия ГС на секретом линии клеток U251 МГБ человека. После действия ГС зарегистрированы статистически значимые изменения в экспрессии 390 белков. Показано значительное влияние ГС на сигнальные пути ОК, связанные с клеточным дыханием, инвазией, протеасомной активностью, презентацией антигенов. В качестве потенциальных прогностических маркеров ГФ МГБ предложен набор из пяти гиперэкспрессированных белков секрета.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Evans S.M., Judy K.D., Dunphy I. et al. Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors. *Clin Cancer Res* 2004;10:8177–84. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1081.
- Cooper L.A.D., Gutman D.A., Chisolm C. et al. The tumor microenvironment strongly impacts master transcriptional regulators and gene expression class of glioblastoma. *Am J Pathol* 2012;180:2108–19. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.01.040.
- Masson N., Ratcliffe P.J. Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer Metab* 2014;2(1):3. DOI: 10.1186/2049-3002-2-3.
- Schito L., Semenza G.L. Hypoxia-inducible factors: master regulators of cancer progression. *Trends Cancer* 2016;2:758–70. DOI: 10.1016/j.trecan.2016.10.016.
- Finger E.C., Giaccia A.J. Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29:285–93. DOI: 10.1007/s10555-010-9224-5.
- Shevchenko V., Arnotskaya N., Kushnir T. et al. Transforming growth factor- β mimics the key proteome properties of CD133-differentiated and CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Int Rev Neurobiol* 2020;151:220–42. DOI: 10.1016/bs.irn.2020.03.007.
- Tesarova P., Kalousova M., Zima T., Tesar V. HMGB1, S100 proteins and other RAGE ligands in cancer – markers, mediators and putative therapeutic targets. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2016;160:1–10. DOI: 10.5507/bp.2016.003.
- Fei F., Qu J., Zhang M., Li Y., Zhang S. S100A4 in cancer progression and metastasis: A systematic review. *Oncotarget* 2017;8:73219–39. DOI: 10.18632/oncotarget.18016.
- Dao Trong P., Rösch S., Mairbäurl H. et al. Identification of a prognostic hypoxia-associated gene set in IDH-mutant glioma. *Int J Mol Sci* 2018;19:2903. DOI: 10.3390/ijms19102903.
- Yu N.M., Ahn J.Y., Choi E.J. et al. Detection of differentially expressed genes in glioblastoma by suppression subtractive hybridization. *J Korean Neurosurg Soc* 2005;37:443–8.
- Lesniak W., Slomnicki L.P., Filipek A. S100A6 – new facts and features. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;4:1087–92. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.10.150.
- Hulleman E., Quarto M., Vernell R. et al. A role for the transcription factor HEY1 in glioblastoma. *J Cell Mol Med* 2009;1:136–46. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00307.x.
- Liu Z., Sanders A.J., Liang G. et al. Hey factors at the crossroad of tumorigenesis and clinical therapeutic modulation of hey for anticancer treatment. *Mol Cancer Ther* 2017;16:775–87. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0576.
- Chen P., Liu H., Hou A. et al. Prognostic significance of zinc finger E-Box-binding homeobox family in glioblastoma. *Med Sci Monit* 2018;24:1145–51. DOI: 10.12659/MSM.905902.
- Lin Y., Chen Y., Wang Y. et al. ZIP4 is a novel molecular marker for glioma. *Neuro-Oncology* 2013;15:1008–16. DOI: 10.1093/neuonc/not042.

Вклад авторов

Т.И. Кушнир: получение данных, анализ полученных данных;
Н.Е. Арноцкая: подготовка образцов для анализа, статистический анализ;
И.А. Кудрявцев: получение секретома клеток мультиформной глиобластомы;
А.А. Митрофанов: обзор публикаций по теме статьи;
А.Х. Бекашев: редактирование черновика рукописи;
В.Е. Шевченко: разработка дизайна исследования, написание текста статьи.

Authors' contributions

T.I. Kushnir: obtaining data, analysis;
N.E. Arnotskaya: preparation of samples for analysis, statistical analysis;
I.A. Kudryavtsev: obtaining a secretome of glioblastoma multiforme cells;
A.A. Mitrofanov: reviewing of publications of the article's theme;
A.K. Bekyashev: analysis of the article, correction of the manuscript;
V.E. Shevchenko: developing the research design, article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Т.И. Кушнир/T.I. Kushnir: <https://orcid.org/0000-0001-9626-6847>
Н.Е. Арноцкая/N.E. Arnotskaya: <https://orcid.org/0000-0002-0154-8604>
И.А. Кудрявцев/I.A. Kudryavtsev: <https://orcid.org/0000-0001-7588-1066>
А.А. Митрофанов/A.A. Mitrofanov: <https://orcid.org/0000-0002-4125-7342>
А.Х. Бекашев/A.K. Bekyashev: <https://orcid.org/0000-0002-4160-9598>
В.Е. Шевченко/V.E. Shevchenko: <https://orcid.org/0000-0002-0401-9900>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Финансируется в рамках госбюджетной темы № 2021-76.
Funding. It is funded under the state budget theme No. 2021-76.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.
Compliance with patient rights and principles of bioethics
This article does not describe any research involving humans or animals as subjects.