

УДК 576.385.5.

РЕКОМБИНАНТНЫЙ АНАЛОГ БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА SLURP-1 ТОРМОЗИТ РОСТ КЛЕТОК ГЛИОМ U251 MG И A172

© 2020 г. М. А. Шулепко¹, М. Л. Бычков¹, Е. Н. Люкманова^{1,*},
академик РАН М. П. Кирпичников^{1,2}

Поступило 13.03.2020 г.
После доработки 16.04.2020 г.
Принято к публикации 16.04.2020 г.

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор альфа-7 типа ($\alpha 7$ -nAChR) считается перспективной мишенью для терапии карцином. Ранее нами было показано, что рекомбинантный аналог белка человека SLURP-1 (rSLURP-1), взаимодействуя с $\alpha 7$ -nAChR и снижая его экспрессию, эффективно ингибирует рост карцином различного происхождения. Экспрессия $\alpha 7$ -nAChR повышена в глиомах по сравнению со здоровым мозгом человека, однако, роль этого рецептора в развитии глиом изучена слабо. В работе впервые показано, что rSLURP-1 значительно ингибирует рост клеток модельных линий глиом U251 MG и A172 до ~70%, что сравнимо с действием α -бунгаротоксина, селективного ингибитора $\alpha 7$ -nAChR. Полумаксимальные эффективные концентрации действия rSLURP-1 на клетки U251 MG и A172 составили 2.82 ± 0.2 и 8.9 ± 0.3 нМ соответственно. Совместная инкубация клеток U251 MG с rSLURP-1 и ингибитором nAChR мекамиламином приводила к ослаблению антипролиферативной активности rSLURP-1, что указывает на nAChR как на мишень действия rSLURP-1 в глиомах.

Ключевые слова: глиомы, никотиновый ацетилхолиновый рецептор, SLURP-1, Lu6/uPAR, трехпептидные белки

DOI: 10.31857/S268673892004023X

Глиомы являются наиболее распространенными первичными опухолями головного мозга. Несмотря на использование современных подходов лечения, сочетающих хирургическую резекцию первичной опухолевой ткани, лучевую и химиотерапию, средняя выживаемость пациентов с глиомами составляет всего 12–15 месяцев [1]. Низкая эффективность терапии глиом обуславливает актуальность поиска новых молекулярных мишеней и разработку новых действующих на них соединений.

Одним из перспективных направлений для разработки новых противоопухолевых препаратов является регуляция работы никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR), в особенности, подтипа, состоящего из пяти одинаковых $\alpha 7$ субъединиц ($\alpha 7$ -nAChR) [2]. Рецепторы этого подтипа вовлечены в процессы регуляции проли-

ферации, миграции и апоптоза раковых клеток, а экспрессия гена *CHRNA7*, кодирующего $\alpha 7$ субъединицу nAChR, повышена в клетках карцином [2]. Кроме того, экспрессия гена *CHRNA7* повышена в глиомах по сравнению с тканями здорового мозга человека [3]. Однако, участие nAChR в возникновении и развитии глиом изучено слабо.

SLURP-1 является секретлируемым белком, экспрессирующимся в эпителии человека [4] и принадлежит семейству трехпептидных белков Lu6/uPAR [5]. Снижение экспрессии гена *SLURP-1* наблюдается при карциномах толстой кишки [6] и легкого [7], в кератиноцитах человека при онкогенной трансформации, вызванной нитрозаминами NNK и NNN, содержащимися в табаке [8], а также в меланомах [9]. В то же время, повышенная концентрация эндогенного SLURP-1 в крови пациентов с раком поджелудочной железы коррелирует с большим временем жизни пациентов после хирургического удаления первичной опухоли [10]. Ранее нами было показано, что рекомбинантный аналог белка человека SLURP-1 (rSLURP-1) является селективным негативным аллостерическим модулятором $\alpha 7$ -nAChR [11], подавляет рост клеток карцином кожи, кишечника и легкого [12, 13], а также снижает экспрессию $\alpha 7$ -nAChR в раковых клетках [12].

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

² Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова Москва, Россия

*e-mail: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

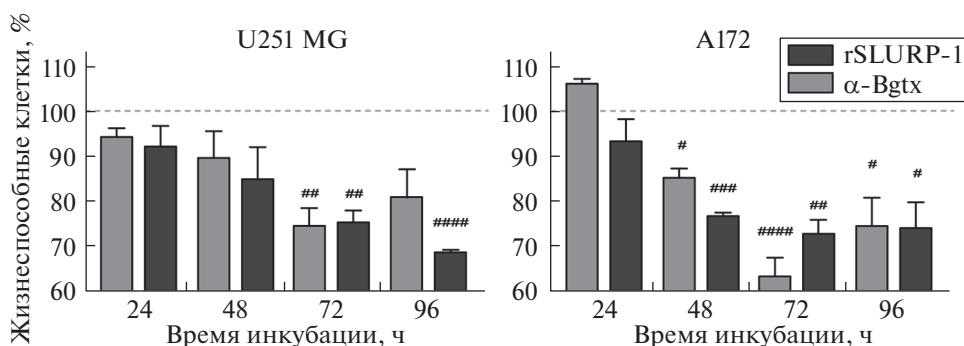


Рис. 1. Влияние α -Bgtx и rSLURP-1 на пролиферацию клеток глиом U251 MG и A172 при разном времени инкубации. Клетки инкубировали с 1 мкМ α -Bgtx и rSLURP-1 в течение 24–96 ч и анализировали влияние препаратов на количество жизнеспособных клеток при помощи МТТ-теста ($n = 3–6$). # ($p < 0.05$), ## ($p < 0.01$), ### ($p < 0.001$) и #### ($p < 0.0001$) означает достоверное отличие групп данных от контроля согласно одностороннему тесту ANOVA с последующим Dunnett's/hoc тестом. 100% жизнеспособных клеток соответствует необработанным клеткам (контроль, пунктирная линия).

В настоящей работе мы исследовали способность препарата rSLURP-1 ингибировать рост клеток модельных глиом U251 MG и A172 (НИИ Цитологии, Россия) (рис. 1). Для этого клетки глиом культивировали в среде IMDM и DMEM соответственно (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Nucleon, Великобритания). Влияние rSLURP-1 на число жизнеспособных клеток изучали при помощи теста на активность митохондриальной сукцинатдегидрогеназы (МТТ-тест). Для этого к клеткам добавляли МТТ (0.1 мг/лунка планшета) и инкубировали в течение 4 ч. МТТ восстанавливался до нерастворимого формазана, после чего кристаллы формазана растворяли в кислом изопропанол. Активность митохондриальной сукцинатдегидрогеназы определяли по поглощению в лунках планшета при 540 нм с выравниванием фона при 650 нм на планшетном ридере Bio-Rad 680. Антипролиферативный эффект rSLURP-1 был также сопоставлен с эффектом α -бунгаротоксина (α -Bgtx), специфического ингибитора $\alpha 7$ -nAChR. Для этого клетки высевали в 96-луночные планшеты (5×10^3 клеток/лунка планшета), культивировали 24 ч, после чего добавляли 1 мкМ α -Bgtx из стока в воде или 1 мкМ rSLURP-1 из стока в 100% ДМСО и дополнительно инкубировали 24–96 ч. Конечная концентрация ДМСО не превышала 0.1% и не влияла на число жизнеспособных клеток, что было подтверждено дополнительными экспериментами. Каждые 24 ч среду в лунках планшета меняли на новую, содержащую те же количества веществ. Было показано, что при инкубации в течение 24 и 48 ч эффект rSLURP-1 на рост клеток U251 MG был незначительным. Однако более продолжительная инкубация клеток с rSLURP-1 в течение 72 ч приводила к снижению числа жизнеспособных клеток до ~76% относительно контрольного уровня (рис. 1). Инкубация

клеток A172 с rSLURP-1 сокращала число жизнеспособных клеток до ~93, ~78 и ~73% от контрольного уровня при инкубации в течение 24, 48 и 72 ч соответственно (рис. 1). Эффект rSLURP-1 на пролиферацию клеток U251 MG и A172 был сопоставим с эффектом α -Bgtx (рис. 1).

Для более детальной характеристики активности rSLURP-1 на клетках U251 MG и A172 были построены кривые доза-эффект при инкубации клеток с рекомбинантным белком в течение 72 ч (рис. 2а). Для клеток U251 MG полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}) составила 2.82 ± 0.20 нМ для rSLURP-1 и 0.24 ± 0.02 нМ для α -Bgtx (рис. 2а, табл. 1). Для клеток A172 EC_{50} составила 8.9 ± 0.3 нМ и 1.3 ± 0.2 нМ для rSLURP-1 и α -Bgtx соответственно (рис. 2а, табл. 1). Таким образом, rSLURP-1 ингибирует пролиферацию клеток глиом с EC_{50} , лежащей в наномолярном диапазоне, но менее эффективно, чем α -Bgtx. Наблюдаемые различия в антипролиферативной активности rSLURP-1 и α -Bgtx могут объясняться тем, что токсин ингибирует ток через канал $\alpha 7$ -nAChR с большей эффективностью, чем rSLURP-1, кроме того, α -Bgtx связывается с $\alpha 7$ -nAChR необратимо [11]. Другим объяснением может быть активация различных внутриклеточных сигнальных путей под действием rSLURP-1 и α -Bgtx. Предполагается, что антипролиферативная активность rSLURP-1 может быть обусловлена регуляцией $\alpha 7$ -nAChR не только по ионотропному пути, связанному с открытием/закрытием канала рецептора, но и по метаботропному механизму [4, 12, 13].

Чтобы подтвердить, что антипролиферативный эффект rSLURP-1 в клетках глиом опосредуется nAChR, мы использовали неспецифический ингибитор nAChR — мекамиламин (Mec). Для изучения влияния мекамиламина на антипролиферативный эффект rSLURP-1 клетки U251 MG

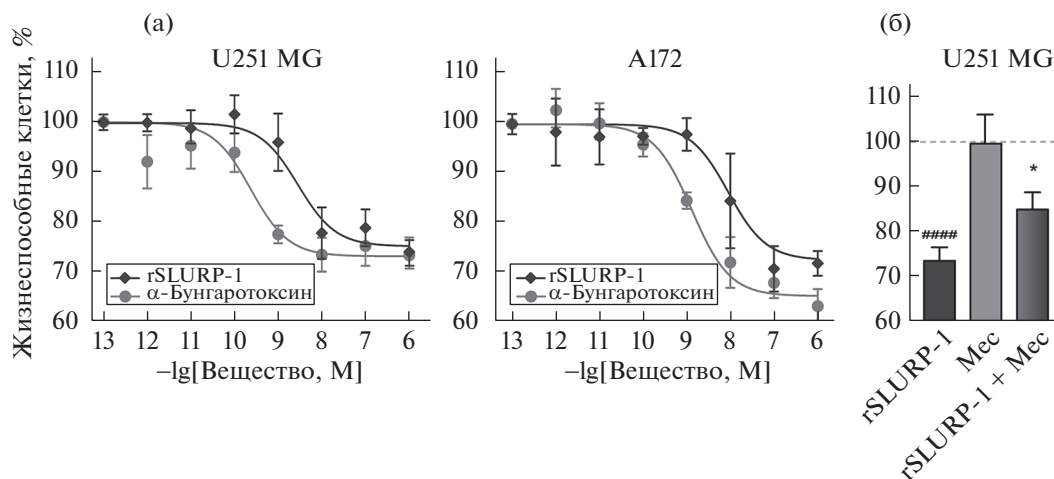


Рис. 2. Анализ антипролиферативного эффекта α -Bgtx и rSLURP-1 на клетках глиом U251 MG и A172 (а). Влияние различных концентраций α -Bgtx и rSLURP-1 на рост клеток U251 MG и A172. Клетки инкубировали 72 ч с различными концентрациями α -Bgtx или rSLURP-1, после чего определяли количество клеток МТТ-тестом ($n = 3-6$). (б). Влияние неспецифического ингибитора nAChR мекамиламина (Mec) на антипролиферативный эффект rSLURP-1 на клетках U251 MG ($n = 3-6$). # ($p < 0.05$) означает отличие групп данных от контроля согласно одностороннему тесту ANOVA с последующим Dunnet's/хос тестом. * ($p < 0.05$) означает отличие групп данных и "rSLURP-1" по одностороннему тесту ANOVA с последующим Dunnet's/хос тестом. 100% жизнеспособных клеток соответствует необработанным клеткам (контроль, пунктирная линия).

прединкубировали с 1 мкМ мекамиламина в течение получаса, после чего добавляли к клеткам 1 мкМ rSLURP-1 и инкубировали дополнительно в течение 72 ч. Мекамиламин сам по себе существенно не влиял на рост клеток U251 MG, однако, при совместном применении с rSLURP-1 число жизнеспособных клеток значительно возрастало по сравнению с клетками, обработанными только rSLURP-1 (рис. 2б). Это подтверждает наше предположение о вовлечении nAChR в антипролиферативную активность rSLURP-1.

Поскольку rSLURP-1 селективно взаимодействует с $\alpha 7$ -nAChR [11], и именно этот рецептор предполагается мишенью действия рекомбинантного белка в раковых клетках [12, 13], мы

провели сравнительный анализ экспрессии генов *CHRNA7* и *SLURP1* в клетках глиомы U251 MG и нормальных астроцитах (рис. 3). Для этого из клеток U251 MG и нормальных астроцитов (Cell Applications, США) выделяли суммарную РНК при помощи реактива Extract RNA (Evrogen, Россия). РНК обрабатывали ДНКазой I (Sigma, США), очищали при помощи набора Clean RNA Standard (Evrogen) и синтезировали кДНК с помощью набора Mint с DNA synthesis kit (Evrogen). ПЦР в реальном времени с полученной кДНК и специфическими праймерами (табл. 2) проводили с помощью готового набора HSqPCRmix (Evrogen) на амплификаторе Roche Light Cycler 96. Данные анализировали при помощи программы Lightcycler

Таблица 1. Параметры антипролиферативного эффекта rSLURP-1 и α -Bgtx на клетках глиом U251 MG и A172

Линия клеток	α -Bgtx EC ₅₀ , нМ	A ₀ , %	rSLURP-1 EC ₅₀ , нМ	A ₀ , %
U251 MG	0.24 ± 0.02	73.8 ± 2.6	2.82 ± 0.20	76.0 ± 2.0
A172	1.3 ± 0.2	65.8 ± 2.0	8.9 ± 0.3	70.1 ± 3.3

Таблица 2. Праймеры, использованные для ПЦР в реальном времени

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Ампликон, п.н.
<i>β-actin</i>	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT	88
<i>GPDH</i>	ACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG	GCCATCACGCCACAGTTTC	73
<i>RPL13a</i>	TCAAAGCCTTCGCTAGTCTCC	GGCTCTTTTGCCCGTATGC	104
<i>CHRNA7</i>	AATGACTCGCAACCACTCACC	TCTGTCCAAGACATTTGCAGCC	116
<i>SLURP-1</i>	AACAGGTCACAGTCAGAGGAGG	CTCGGAAGCAGCAGAAGATCAG	280

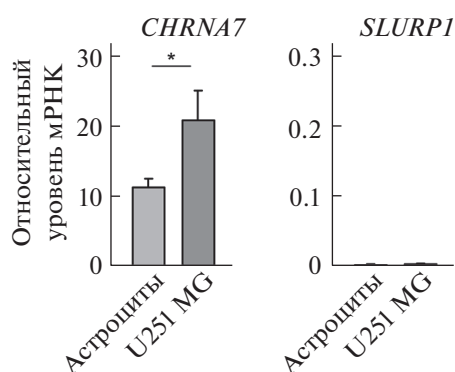


Рис. 3. Сравнительный анализ экспрессии генов *CHRNA7* и *SLURP1* в клетках глиомы U251 MG и нормальных астроцитах по данным ПЦР в реальном времени. * означает достоверное отличие между группами данных согласно двустороннему *t*-тесту.

SW. Экспрессию целевых генов нормировали на экспрессию генов домашнего хозяйства β -*ACTIN*, *GPDH* и *RPL13a*. Было обнаружено, что в клетках U251 MG экспрессия гена *CHRNA7* повышена по сравнению с нормальными астроцитами (рис. 3). В то же время, нам не удалось выявить экспрессию гена *SLURP1* ни в нормальных астроцитах, ни в клетках глиомы U251 MG (рис. 3), что согласуется с данными [3].

Интересно, что существенный антипролиферативный эффект rSLURP-1 на клетках карцином толстой кишки, кожи, груди и легкого был замечен уже после 24 ч инкубации с препаратом [12, 13]. Для раковых клеток кожи и легкого наблюдалась заметная секреция эндогенного SLURP-1 во внеклеточное пространство уже после 1 ч инкубации с рекомбинантным препаратом, что, вероятно, приводит к значительному локальному увеличению концентрации SLURP-1 и межклеточной ауто/паракринной сигнализации [12, 13]. Можно предположить, что замедленный эффект действия rSLURP-1 на клетках глиом, наблюдающийся только после 48 ч, связан с отсутствием экспрессии эндогенного SLURP-1, и как следствие невозможностью быстро увеличить концентрацию SLURP-1 во внеклеточном пространстве. Вероятно, отсроченный эффект rSLURP-1 на клетках глиом скорее связан не с прямым взаимодействием рекомбинантного белка с рецептором, а с изменениями в экспрессии различных регуляторных молекул, вовлеченных в контроль клеточной пролиферации. Эти изменения могут происходить в результате активации различных внутриклеточных сигнальных каскадов в несколько этапов, как это было показано для другого Ly6/uPAR белка человека Lynx1 [14].

Таким образом, в настоящей работе впервые показано, что rSLURP-1 в наномолярных концентрациях ингибирует рост клеток глиом U251 MG и A172, и установлено, что активность реком-

бинантного белка связана с nAChR. Полученные данные указывают на необходимость дальнейших исследований антипролиферативного действия rSLURP-1 и перспективность разработки препаратов на основе этого белка для терапии глиом.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект № 17-74-20161).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ostrom Q.T., Gittleman H., Truitt G., et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015 // *Neuro-Oncol.* 2018. V. 20. iv1–iv86.
2. *Wang S., Hu Y.* $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in lung cancer // *Oncol. Lett.* 2018. V. 16. P. 1375–1382.
3. The UCSC Xena platform for public and private cancer genomics data visualization and interpretation | bioRxiv
4. *Chernyavsky A.I., Arredondo J., Galitovskiy V., et al.* Up-regulation of nuclear factor- κ B expression by SLURP-1 is mediated by $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor and involves both ionic events and activation of protein kinases // *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 2010. V. 299. P. 903–911.
5. *Loughner C.L., Bruford E.A., McAndrews M.S., et al.* Organization, evolution and functions of the human and mouse Ly6/uPAR family genes // *Hum. Genomics.* 2016. V. 10. P. 10.
6. *Pettersson A., Nylund G., Khorram-Manesh A., et al.* Nicotine induced modulation of SLURP-1 expression in human colon cancer cells // *Auton. Neurosci.* 2009. V. 148. P. 97–100.
7. *Russo P., Cardinale A., Margaritora S., et al.* Nicotinic receptor and tobacco-related cancer // *Life Sci.* 2012. V. 91. P. 1087–1092.
8. *Arredondo J., Chernyavsky A.I., Grando S.A.* SLURP-1 and -2 in normal, immortalized and malignant oral keratinocytes // *Life Sci.* 2007. V. 80. P. 2243–2247.
9. *Bergqvist C., Kadara H., Hamie L., et al.* SLURP-1 is mutated in Mal de Meleda, a potential molecular signature for melanoma and a putative squamous lineage tumor suppressor gene // *Int. J. Dermatol.* 2018. V. 57. P. 162–170.
10. *Throm V.M., Männle D., Giese T., et al.* Endogenous CHRNA7-ligand SLURP1 as a potential tumor suppressor and anti-nicotinic factor in pancreatic cancer // *Oncotarget* 9. 2018.
11. *Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Kudryavtsev D., et al.* Human Secreted Ly-6/uPAR Related Protein-1 (SLURP-1) Is a Selective Allosteric Antagonist of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor // *PloS One.* 2016. V. 11. e0149733.
12. *Lyukmanova E., Bychkov M., Sharonov G., et al.* Human secreted proteins SLURP-1 and SLURP-2 control the growth of epithelial cancer cells via interactions with nicotinic acetylcholine receptors: Actions of human SLURP proteins on cancer cells // *Br. J. Pharmacol.* 2018. V. 175. P. 1973–1986.

13. *Shulepko M.A., Bychkov M.L., Shlepova O.V., et al.* Human secreted protein SLURP-1 abolishes nicotine-induced proliferation, PTEN down-regulation and $\alpha 7$ -nAChR expression up-regulation in lung cancer cells // *Int. Immunopharmacol.* 2020. V. 82. P. 106303.
14. *Bychkov M., Shenkarev Z., Shulepko M., et al.* Water-soluble variant of human Lynx1 induces cell cycle arrest and apoptosis in lung cancer cells via modulation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors // *PloS One.* 2019. V. 14. e0217339.

RECOMBINANT ANALOGUE OF THE HUMAN PROTEIN SLURP-1 INHIBITS THE GROWTH OF U251 MG AND A172 GLIOMA CELLS

M. A. Shulepko^a, M. L. Bychkov^a, E. N. Lyukmanova^{a,#}, and academician of the RAS M. P. Kirpichnikov^{a,b}

^a *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russian Federation*

^b *Biological Faculty of the Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru*

The $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ -nAChR) is considered as a promising pharmacological target for the carcinomas therapy. We have previously shown that the recombinant analogue of the human protein SLURP-1 (rSLURP-1) effectively inhibits the growth of carcinomas of various origins via the interaction with $\alpha 7$ -nAChR and down-regulation of expression of this receptor. Expression of $\alpha 7$ -nAChR is increased in gliomas compared to a healthy human brain tissues; however, the role of this receptor in the gliomas development is poorly understood. It was shown for the first time that rSLURP-1 significantly inhibits the growth of glioma model cells U251 MG and A172 up to ~70%, which is comparable with an action of α -bungarotoxin, a selective $\alpha 7$ -nAChR inhibitor. The half-maximum effective concentrations of rSLURP-1 on U251 MG and A172 cells were 2.82 ± 0.2 and 8.9 ± 0.3 nM, respectively. Co-incubation of U251 MG cells with rSLURP-1 and nAChR inhibitor mecamylamine attenuates the antiproliferative activity of rSLURP-1, indicating nAChR as a molecular target for the rSLURP-1 action in gliomas.

Keywords: gliomas, nicotinic acetylcholine receptor, SLURP-1, Ly6/uPAR, three-finger proteins