

**НОВЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ ГЛИОБЛАСТОМ:
АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ, ОЦЕНКА
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К РАДИО- И ИММУНОТЕРАПИИ**

© 2024 г. С. С. Емельянова^{1,*}, А. В. Волницкий¹, А. М. Соляник^{1,2}, Н. Х. Чан^{1,2}, Л. А. Гараева¹, Р. А. Пантина¹, М. Н. Грунина¹, Е. Д. Путевич^{1,2}, А. С. Потысьева^{1,2}, А. М. Голубев¹, В. С. Бурдаков¹, Н. А. Верлов¹, С. Н. Нарыжный^{1,3}, А. Л. Конева^{1,2,4,**}, Т. А. Штам^{1,4,5,***}

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Гатчина, Россия

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

³Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

⁴Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

⁵Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: emelyanova_ss@pnpi.nrcki.ru

**E-mail: konevega_al@pnpi.nrcki.ru

***E-mail: shtam_ta@pnpi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 28.11.2023 г.

После доработки 22.04.2024 г.

Принята к публикации 24.04.2024 г.

Представлена характеристика шести новых клеточных линий глиобластом, полученных из опухолевого материала пациентов. Исследуемые глиобластомы не имели мутаций в генах *IDH1* и *IDH2*, что указывало на плохой прогноз их терапии. Две глиобластомы несли патогенную мутацию p.Arg110-Pro в гене *TP53*. Все исследуемые клеточные линии экспрессировали РНК онкосупрессорной и онкогенных изоформ белка p73. Глиобластомы по-разному отвечали на радиотерапию, причем пять из них были более устойчивы к γ -облучению, чем стандартная линия глиомы A172. Все шесть клеточных линий экспрессировали РНК генов фактора эндотелиального роста сосудов и его рецептора (VEGFR-1) в различных соотношениях. Тестирование иммунотерапевтической схемы с моноклональными антителами к VEGFR-1 на одной из клеточных линий подтвердило, что исследуемые глиобластомы чувствительны к блокированию фактора роста сосудов и его рецептора. Таким образом, данные глиобластомы могут стать перспективной моделью для исследования формирования устойчивости опухолевых клеток к радиотерапии и эффективности проведения иммунотерапии, блокирующей факторы роста и их рецепторы.

DOI: 10.56304/S1992722324601824

ВВЕДЕНИЕ

Глиобластомы – это наиболее частые и агрессивные первичные опухоли головного мозга IV (наивысшей) степени, плохо поддающиеся лечению [1, 2]. По классификации WHO (World Health Organization) 2021 г. они относятся к взрослому типу диффузных глиом с не мутировавшими генами *IDH* [3]. Глиобластомы не имеют четких границ и глубоко проникают в соседние ткани. Полностью удалить их хирургическим путем практически невозможно, поэтому для лечения используют комплексные подходы, совмещающие в себе хирургию, радиотерапию и химиотерапию алкилирующими агентами [4]. Однако, несмотря на агрессивное лечение, рецидивы опухоли возникают в 80% случаев, более того, часто

развивается устойчивость к терапии, что делает эти опухоли де-факто неизлечимыми [5].

Глиобластомы обладают высокой степенью гетерогенности. Они могут значительно различаться у разных пациентов, более того, сами составляющие опухоль клеточные популяции не однородны и могут иметь значительные различия по морфологии, фенотипу и генетическим особенностям [6]. Получение клеточных линий из опухолевых биоптатов позволяет детально изучать фенотипические, биохимические и генетические особенности различных глиобластом, выявлять молекулярные маркеры, на основе которых в дальнейшем можно будет подбирать более конкретные, возможно даже индивидуальные схемы терапии опухолей головного мозга.

Одним из наиболее важных молекулярных маркеров для глиом, позволяющих определить прогноз заболевания и выбрать стратегию лечения, является статус изоцитратдегидрогеназ IDH1 и IDH2 [7, 8]. Изоцитратдегидрогеназа — это фермент, катализирующий реакцию превращения изолимонной кислоты в α -кетоглутаровую внутри цикла трикарбоновых кислот. IDH вовлечена во многие метаболические процессы, например передачу сигналов, синтез липидов, окислительный стресс и окислительное дыхание. Мутации в генах *IDH1* и *IDH2* найдены в 70–80% диффузионных астроцитом II–III степени злокачественности, олигодендроглиомах и вторичных глиобластомах, но почти не встречаются в первичных глиобластомах [9].

Еще одним маркером, определяющим характер развития глиом и их ответ на терапию, является статус транскрипционного фактора p53 [8]. Белок p53 — это основной “страж генома”, который активируется в ответ на гипоксию, окислительный стресс, гипо- и гипертермию, повреждения ДНК (в том числе возникающие в ходе радиотерапии), уменьшение пула нуклеотидов, активацию онкогенов и вызывает апоптоз, остановку клеточного цикла, подавление неоангиогенеза. Наибольшее количество мутаций, приводящих к дисфункциям белка p53, находится в “цинковом пальце” — ДНК-связывающем домене, кодируемом экзонами с четвертого по восьмой. Большинство мутаций сосредоточено между аминокислотами 125–300, основная часть которых приводит к замене одной аминокислоты на другую, что в свою очередь вызывает изменение в структуре белка и ограничивает его функциональность [10, 11]. Как онкосупрессор p53 хорошо изучен и в глиомах [9]. Показано, что в глиобластомах мутации *TP53* наблюдаются значительно реже, чем в глиомах IV степени других типов [12]. Однако в 78% случаев глиобластом присутствуют нарушения если не в самом белке p53, то в путях его регуляции [13].

Белок p73 является гомологом p53 и регулирует экспрессию ряда общих с ним генов-мишеней, однако мутации в гене *p73* встречаются редко (1% случаев) [14]. Во многих опухолях наблюдается даже суперэкспрессия белка p73 [15]. С гена *p73* могут экспрессироваться как полноразмерные (онкосупрессорные), так и укороченные (онкогенные) изоформы [16]. Показано, что укороченные изоформы могут подавлять транскрипционную активность как TAp73 с полным *транс*-активирующим доменом, так и p53, образуя с ними гетеротетрамеры и конкурируя за сайты связывания с ДНК. Таким образом, судьба клетки зависит от соотношения количеств этих изоформ [17]. Белок p73 может играть важную роль в дифференциации глиобластом [18]. Показано, что существует корреляция между уровнями РНК изоформы TAp73 и Δ Np73, злокачественностью опу-

холи и выживаемостью пациентов [19]. Таким образом, p73 можно рассматривать как потенциальный биомаркер степени злокачественности глиобластомы.

Современным подходом к лечению глиобластом является иммунотерапия, направленная на блокирование синтетическими антителами факторов роста и их рецепторов. Глиомы являются одними из наиболее васкуляризированных и отечных опухолей, поскольку они экспрессируют высокие уровни факторов роста эндотелия сосудов (VEGF) [20]. Анти-ангиогенная терапия давно применяется при лечении глиом. Так, бевацизумаб (торговое наименование Авастин), гуманизированное моноклональное антитело против VEGF, продемонстрировал терапевтический эффект у многих пациентов с глиобластомами при использовании отдельно или в сочетании с другими видами терапии [21]. Рецептор-1 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR-1) представляет собой тирозинкиназный рецептор, который связывается с лигандами семейства VEGF [22]. Помимо экспрессии в опухолевом эндотелии, VEGFR-1 обнаруживается на поверхности самих опухолевых клеток и клетках опухолевого микроокружения. Блокирование VEGFR-1 приводит к подавлению пролиферации и усилению апоптоза опухолевых клеток, уменьшению васкуляризации опухолевого узла, подавлению инвазии и метастазирования опухоли [23]. При этом в неопухолевых клетках VEGFR-1 задействован в ангиогенезе опосредованно и его блокирование антителами не токсично для организма больного [24].

В данном исследовании провели генетическую характеристику новых клеточных линий глиобластом, а также оценку их чувствительности к радиотерапии и иммунотерапии моноклональными антителами, связывающими фактор роста VEGF-A и его рецептор VEGFR-1.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культуры клеток. Клеточная линия A172 (глиобластома) была получена из коллекции Института цитологии РАН (Россия), клеточные линии глиобластом G1–R, G1–Tr, G1–L, G1–Sh, G1–C, G1–F получены в лаборатории Клеточной биологии (НИЦ “Курчатовский институт” — ПИЯФ, Россия) из опухолевой ткани пациентов. Клетки культивировали в полной среде DMEM-F12 (Биолот, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HiMedia, Индия) и 0.5% гентамицина при 37°C в атмосфере 5%-ного CO₂. Количество клеток подсчитывали с помощью автоматического счетчика клеток LUNA-II™ (Logos Biosystems, Korea).

Выделение ДНК, ПЦР и секвенирование. Выделение ДНК из осадка 1 млн клеток проводили на-

бором KR-012 (Omnix, Россия) согласно инструкции фирмы-производителя. Концентрацию ДНК в образцах измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop One (Thermo FS, США). Амплификацию фрагментов ДНК генов *IDH-1*, *IDH-2*, *KRAS* и *TP53* проводили с помощью ПЦР. Реакционная смесь (60 мкл) содержала однократный Turbo-буфер для Taq-HS-полимеразы, 2.5 ед. Taq-HS-полимеразы (Евроген, Россия), 250 мкМ каждого dNTP, 300 нМ прямого и обратного праймера (3'-5' *IDH-1*: f-gag aat cgt gat gcc acc aa, r-ttg gaa att tct ggg cca tga, *IDH-2*: f-tct ggc tgt gtt gtt gct tg, r-aga gac aag agg atg gct ag, *KRAS*: f-ggt cct gca cca gta ata tgc, r-tac gat aca cgt ctg cag tca ac, p53, третий–четвертый экзон: f-cag ccc cct agc aga gac ct, r-ggt gaa gag gaa tcc caa agt tcc, пятый–шестой экзон: f-tct cct tcc tct tcc tac agt act cc r-gga ggg cca ctg aca acc acc ctt, седьмой–восьмой экзон: f-gcc tca tct tgg gcc tgt gtt atc tc, r-tgg tct ctg cac cgc ttc ttg t) и 0.2 мкг ДНК. Реакцию проводили на амплификаторе T100 Thermal Cycler (BioRad, США): 5 мин, 95°C (активация полимеразы), 35 циклов: денатурация ДНК (95°C, 30 с), отжиг праймеров (60°C, 25 с), элонгация (72°C, 45 с). Визуализацию полученных фрагментов проводили с помощью электрофореза в 6%-ном полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием. Полученный фрагмент ДНК очищали от низкомолекулярных фрагментов и остатков фермента с помощью набора Cleanup Standard (BC022S, Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Секвенирование по Сенгеру проводили на генетическом анализаторе “Нанофор 05” (ИАП РАН, Россия). Результаты анализировали с помощью программы SnapGene Viewer.

Выделение тотальной РНК и ОТ-ПЦР в реальном времени. Тотальную РНК выделяли, используя реагент ЛИРА (LRU-100-50, Biolabmix, Россия) согласно инструкции производителя. Концентрацию тотальной РНК в образцах измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop One (Thermo FS, США). Тотальную РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo FS, США) при 37°C, 40 мин для деградации геномной ДНК. Экспрессию генов *TP73*, *VEGF-A* и *VEGFR-1* оценивали с помощью ОТ-ПЦР. Для реакции использовали набор Genta Single-tube RT-PCR-мастер-микс (RT-M-003, GenTerra, Россия). Реакционная смесь (25 мкл) содержала однократную мастер-микс, 375 нМ прямого, обратного праймера и зонда ([25], 3'-5' *VEGF-A* f-gag gca gct tga gtt aaa c, r-ttc tgt cga tgg tga tgg tg, p-FAM-tgc aga tgt gac aag ccg agg c-BHQ1, *VEGFR-1* f-tca gca cat tcc cta gtg ag, r-cac agg tgg ttt gcg tat gt, p-FAM-tac tgg ctg ctg gca gcg gct-BHQ1, actin f-atg cag aag gag atc act gc, r-ata ctg ctg ctt gct gat cc, p-FAM-ctc att gct cct cct gag cgc aa-BHQ1) и 0.5 мкг РНК. Реакцию проводили на амплификаторе CFX96 Touch™ (BioRad, США): 30 мин, 50°C (обратная транскрипция),

15 мин, 95°C (активация полимеразы) и 45 циклов: денатурация фрагмента ДНК (95°C, 15 с), отжиг праймеров и зонда (58°C, 30 с), элонгация (72°C, 60 с). Относительную экспрессию генов мишеней определяли по значениям пороговых циклов и нормировали на экспрессию гена актина.

Облучение клеток и оценка жизнеспособности. Клетки всех линий глиом облучали градуированными дозами 1–8 Гр рентгеновского излучения с энергией 35 КэВ или γ -излучением с энергией 1.2 МэВ с использованием ^{60}Co -источника γ -лучей “Исследователь” (НИЦ “Курчатовский институт” – ПИЯФ, Россия), а их жизнеспособность оценивали с помощью AlamarBlue (резазурин) теста [1].

Проточная цитометрия. Клетки линий A172 и G1-Tg фиксировали 4%-ным формальдегидом. Часть клеток дополнительно обрабатывали 0.5%-ным раствором тритона для пермеабиллизации мембраны. Инкубировали с первичными антителами клонов 4C1 и 3B12 к VEGFR-1 (monoclonal mouse, 0.1 мкг/мл) 12 ч, 4°C. Окрашивали вторичными антителами anti-mouse-Alexa488 (17c01220, Hansa BioMedLife Science, Эстония, 1 нг/мл) в течение 1 ч при 4°C и визуализировали на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter) при длине волны лазера 480 нм, накапливая минимум 20 000 событий.

Оценка жизнеспособности клеток в режиме реального времени. Культуры клеток A172 и G1-Tg высаживали в Е-плашки в концентрации 2×10^4 клеток/лунку и помещали в прибор xCELLigence Real-Time Cell Analysis (37°C, CO₂). Через 24 ч среду заменяли на новую с моноклональными антителами к рецепторам VEGFR-1 (клоны 4C1, 3B12), препаратом Авастин в концентрации 1 мг/мл или их комбинацией в концентрации по 0.5 мг/мл каждого. За ростом клеток наблюдали в течение 10 дней.

Статистический анализ. Эксперименты по анализу экспрессии, а также пролиферации клеток проводили минимум в трех повторах. Визуализация и анализ данных были осуществлены при помощи программного обеспечения GraphPad Prism. Обработка данных проточной цитометрии и их визуализация осуществлены при помощи плагина со свободным доступом Floreada.io. Результаты на гистограммах представлены как среднее \pm SD. Данные сравнивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с использованием теста Тьюки для поправок на множественные сравнения. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гетерогенность глиобластом является одной из их особенностей. Популяции клеток, состав-

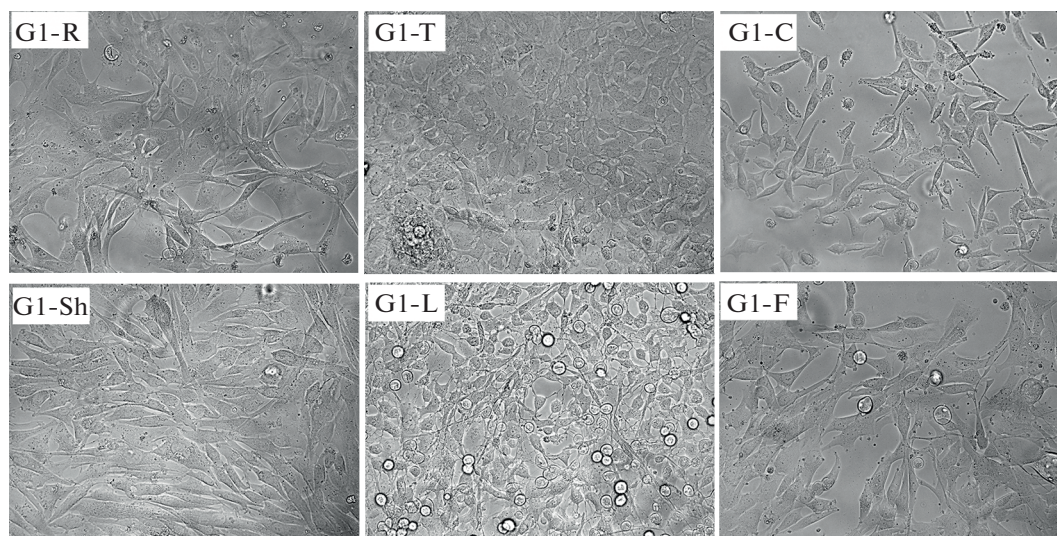


Рис. 1. Микрофотографии глиобластом. Микрофотографии клеток линий G1–R, G1–Tr, G1–L, G1–Sh, G1–C, G1–F получены с помощью микроскопа Life Technologies Evos (Thermo FS, UK) при увеличении $\times 20$.

ляющих опухоль, могут различаться как у разных пациентов, так и внутри одного образования, поэтому для поиска прогностических молекулярных маркеров и разработки терапевтических схем целесообразно использовать сразу несколько различающихся между собой клеточных линий. Работы по получению и характеристике новых клеточных линий глиобластом ведутся с середины XX века и до сих пор не теряют своей актуальности в связи с неэффективностью противоопухолевой терапии и низкой выживаемостью пациентов [6]. Наиболее перспективной стратегией проведения исследований является использование культивируемых клеточных линий, полученных из биоптатов пациентов, и их сравнение с существующими стандартными линиями глиом. На рис. 1 представлены фотографии глиобластом G1–R, G1–Tr, G1–L, G1–Sh, G1–C, G1–F, полученных из опухолевого материала пациентов. Клеточные культуры различаются по размеру и форме клеток и особенностям роста, что делает их потенциально интересными моделями для тестирования схем противоопухолевой терапии.

Мутации в генах изоцитратдегидрогеназы. Наличие мутаций в генах изоцитратдегидрогеназы является важным прогностическим маркером. Глиомы с мутировавшими генами *IDH1* и *IDH2* лучше отвечают на терапию и имеют более благоприятный прогноз лечения [26]. В глиобластомах гены *IDH1* и *IDH2* изменены крайне редко. Наиболее частыми мутациями в *IDH* являются замены консервативных аргининов в положениях R100, R109, R119, R132 для 1 типа *IDH* и R140, R149, R159, R172 для 2 типа на гистидины, что приводит к появлению дополнительной функции фермента, посредством которой он преобразует

α -кетоглутарат (α -KG), нормальный продукт, в D-2-гидроксиглутарат (D-2HG). Как это способствует онкогенезу, в настоящее время непонятно, но, вероятно, связано с воздействием D-2HG на деметилазы ДНК, что способствует метилированию ДНК и гистонов [8, 27]. Выбранные праймеры полностью охватывали области генов *IDH1* и *IDH2*, содержащих “горячие точки”, но ни в одной из исследованных глиобластом не было выявлено замен в консервативных аргининах. Следовательно, G1–R, G1–Tr, G1–L, G1–Sh, G1–C, G1–F являются глиобластомами “дикого” типа по *IDH*, относятся к глиомам с плохим прогнозом лечения и являются хорошей моделью для подбора и тестирования схем противоопухолевой терапии.

Мутации в гене TP53. Мутации в *IDH* часто сопряжены с мутациями в p53 или с ко-делецией в хромосомах 1p/19q. В глиобластомах мутации в гене *TP53* встречаются в только 20–30% случаев, в глиомах IV степени с мутировавшим геном *IDH* – в 60–70% случаев. Подавляющее количество описанных мутаций в гене *TP53* сосредоточено между 125 и 300 кодонами. Выбранные праймеры располагались в интронах и охватывали все “горячие области”.

В G1–Tr и G1–L была обнаружена патогенная мутация rs11540654 в позиции 110-й аминокислоты с.329G > C (p.Arg110Pro). Эта мутация мало описана в литературе. Она встречается при синдроме Ли–Фраумени [28]. Замена аргинина на пролин может приводить к конформационным изменениям в активном центре белка. Аргинин несет два основных центра: аминокислотную группу в α -положении, способную образовывать множественные водородные и ионные связи, и гуанидиновую

в δ -положении. В молекуле пролина атом азота не связан с атомом водорода и не может быть донором водорода при формировании водородной связи. Кроме того, пролин сильно изгибает пептидную цепь. Таким образом, замена Arg на Pro в ДНК-связывающем домене белка p53 может сильно влиять на его функции.

Полиморфизм rs1042522 в четвертом экзоне в позиции 72-й аминокислоты с.215C > G (p.Pro72Arg) относится к доброкачественным изменениям, широко описанным в литературе [29, 30]. Считается, что выбор аминокислоты в данной позиции происходит под действием “естественного отбора” в зависимости от широты и количества УФ-излучения. У европейцев состав данного полиморфизма 60, 30 и 10% для Arg/Arg, Arg/Pro и Pro/Pro соответственно. В исследуемых глиобlastомах полиморфизм Pro/Pro наблюдался в G1-R, G1-Tr и G1-L, полиморфизм Arg/Arg – в G1-Sh, полиморфизм Arg/Pro – в G1-C и G1-F.

Делеция rs59758982 в 16 пар оснований в третьем интроне, которая классифицируется как полиморфизм и относится к доброкачественным изменениям, не влияющим на функции белка p53, была обнаружена у всех шести исследуемых глиобlastомах.

Полиморфизмы rs12951053 и rs12947788 (14181C > T, 14201T > G) являются сцепленными, находятся в седьмом интроне и могут способствовать образованию дефектного белка p53 [31]. В исследуемых глиобlastомах полиморфизмы наблюдались в G1-R, G1-Tr, G1-L в гомозиготном варианте и в G1-C, G1-F в гетерозиготном варианте.

Таким образом, исследуемые глиобlastомы различаются по полиморфизмам в гене TP53, кроме того, две из них имеют патогенную мутацию, что делает перспективным их совместное использование для исследования новых стратегий в радио- и химиотерапии.

Экспрессия изоформ белка p73. Во многих опухолях, в том числе глиобlastомах, наблюдаются сверхэкспрессия полноразмерной (онкосупрессорной) изоформы TA белка p73 и появление его укороченных (онкогенных) изоформ, что способствует прогрессии опухоли, опосредуя ангиогенез и повышая выживаемость опухолевых клеток, и является неблагоприятным прогнозом для терапии. Изоформы белка p73 могут различаться по N- и C-концу [32] (табл. 1). Среди укороченных по N-концу изоформ наиболее значимую роль в развитии опухоли играют Dex2p73, Dex2/3p73, ΔN^{\prime} p73 и ΔN p73 [25]. Анализ N-концевых изоформ выявил (рис. 2а) экспрессию полноразмерной изоформы TAp73 в глиобlastомах G1-R, G1-Tr, G1-Sh, G1-C, G1-F и появление укороченных изоформ во всех шести клеточных линиях, причем в G1-L, G1-Tr, G1-Sh, G1-C наблюдалась

Таблица 1. Экзонный состав изоформ белка p73

N-конец		C-конец	
Изоформа	Экзонный состав	Изоформа	Экзонный состав
TA	1–2–3–4	α	10–11–12–13–14
Dex2	1–3–4	β	10–11–12–14
Dex2/3	1–4	γ	10–12–13–14
ΔN^{\prime}	1–2–3–3′–4	ϵ	10–12–14
ΔN	3′–4	ζ	10–13–14
		δ	10–14

экспрессия всех четырех проанализированных изоформ, а в G1-R и G1-F отсутствовала экспрессия изоформы Dex2/3p73.

В G1-R, G1-Tr, G1-C экспрессия p73 была значительно выше, чем в культуре A172. В культурах и G1-Sh суммарная экспрессия РНК укороченных изоформ выше, чем экспрессия полноразмерной изоформы TAp73 (отношение экспрессии TAp73 к сумме экспрессий укороченных изоформ 0.5). В G1-L полностью отсутствовала экспрессия полноразмерной изоформы TAp73. В G1-F отношение экспрессии полноразмерной изоформы к укороченным равно единице. Для G1-R, G1-Tr, G1-C и A172 экспрессия РНК полноразмерной изоформы была выше экспрессии укороченных в 3.6, 1.5, 2 и 1.3 раза соответственно.

Анализ C-концевых изоформ белка p73 показал, что во всех исследуемых глиобlastомах были обнаружены полноразмерная α и укороченные β , γ , ϵ и δ (рис. 2б). В линии G1-Tr дополнительно наблюдалась изоформа ζ .

В настоящее время радиотерапия является одним из основных способов лечения опухолей головного мозга, однако многие глиобlastомы обладают довольно высокой радиорезистентностью, а повышение дозы радиации губительно и для здоровых клеток мозга. Одними из причин резистентности к облучению могут быть повышенная экспрессия белка p73 и появление его онкогенных изоформ в глиобlastомах [33]. Накопление разрывов в ДНК в ответ на облучение должно приводить к активации белков семейства p53 и запуску апоптоза. Транскрипционные факторы p53 и p73 функционируют как тетрамеры. Укороченные по N-концу изоформы белка p73 могут встраиваться в тетрамеры как p73, так и p53 и препятствовать их нормальной работе [34]. Кроме того, дефектные белки конкурируют за сайты связывания с полноценными транскрипционными факторами и препятствуют запуску экспрессии РНК генов-мишеней, отвечающих за развитие апоптоза. Более того, изоформа ΔN p73 способна присоединяться непосредственно к месту повреждения ДНК, взаимодействовать с сен-

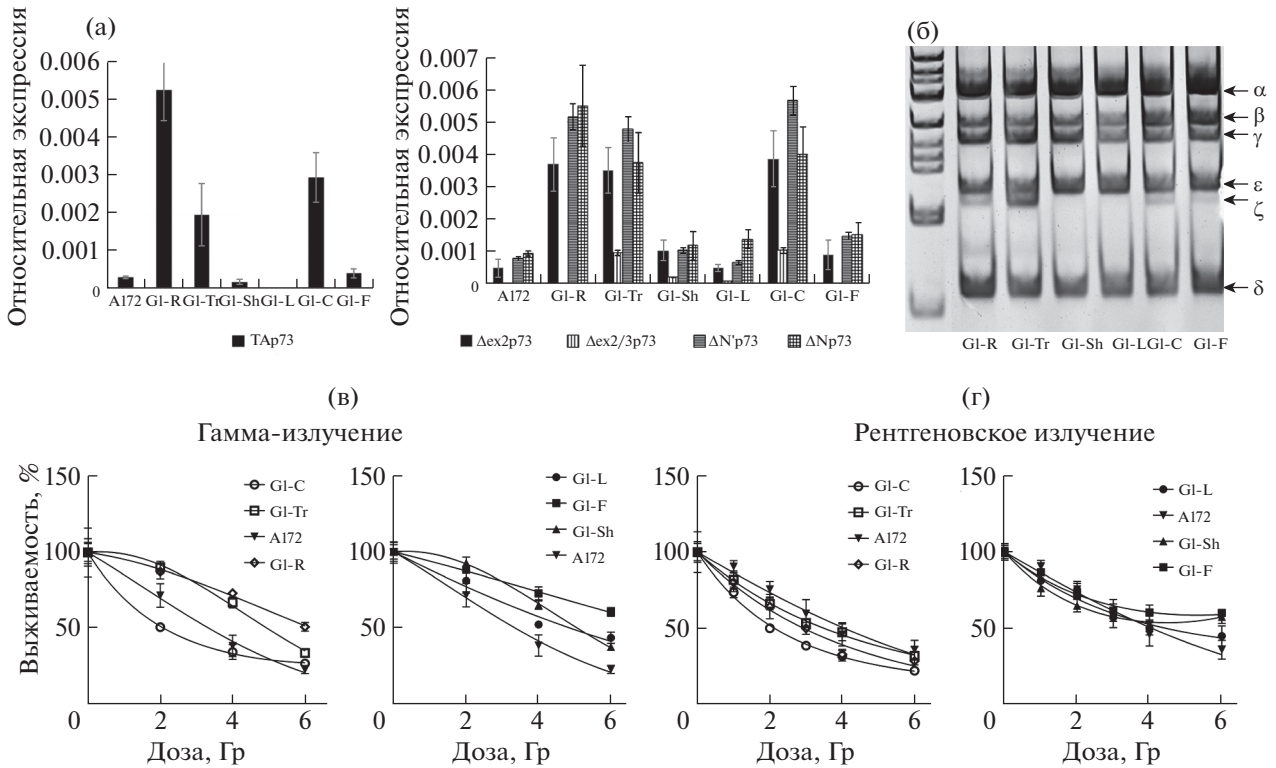


Рис. 2. Уровень экспрессии изоформ гена *TP73* в клеточных линиях глиобластом и их чувствительность к радиотерапии: а – относительный уровень экспрессии РНК N-концевых изоформ гена *TP73*, б – наличие С-концевых изоформ гена *TP73*; выживаемость линий глиобластом (данные резазурина-теста) после облучения γ -радиацией (в) или рентгеном (г) в диапазоне доз 0–6 Гр.

сорным белком 53BP1, определяющим наличие разрыва, и ингибировать активацию ATM, фосфорилирование белка p53 и запуск апоптоза [26]. Различные соотношения количеств онкогенных и онкосупрессорной изоформ p73 могут приводить к тому, что глиобластомы будут по-разному отвечать на различные дозы и виды облучения. В исследуемых клеточных линиях ген *p73* высокоэкспрессирован, а укороченные по N-концу изоформы присутствуют в разных количествах, что делает совместное использование GI-R, GI-Tr, GI-Sh, GI-L, GI-C и GI-F перспективной моделью для исследования радиорезистентности.

Чувствительность линий глиобластом к γ -облучению. Из исследуемых глиобластом наиболее чувствительной к γ -радиации оказалась GI-C (рис. 2в). Самой устойчивой была GI-F. Интересно, что у этих глиобластом полностью совпадает p-53-статус (нет патогенных мутаций, а все обнаруженные полиморфизмы встречаются в гетерозиготном состоянии), при этом соотношение экспрессии РНК полноразмерной и укороченных изоформ p73 для GI-C – 2.0, а для GI-F – 1.0. GI-R, GI-Tr, GI-Sh и GI-L были устойчивее к γ -радиации, чем культура A172. При этом GI-Sh с не мутировавшим p53, но с соотношением изоформ белка p73 0.5 вела себя так же, как и GI-Tr с бел-

ком p53, несущим патогенную мутацию, и соотношением изоформ p73 1.5. GI-L должна была оказаться наиболее устойчивой к радиотерапии, однако при дозах 2 и 4 Гр она отвечала на γ -радиацию сильнее GI-Tr, GI-Sh, но при 6 Гр в ней сохранялось больше жизнеспособных клеток. В GI-R соотношение изоформ p73 было заметно сдвинуто в сторону TAp73, в белке p53 отсутствовали мутации, но клеточная линия оказалась устойчивой к γ -излучению. Вероятно, механизм резистентности здесь формируется из-за повреждений каких-либо других молекулярных путей.

Чувствительность к облучению рентгеном. Из исследуемых глиобластом наиболее чувствительной к рентгену также была GI-C (рис. 2г). Остальные глиобластомы показали примерно одинаковую чувствительность к дозам 1–3 Гр. При дозе 4 Гр GI-F оказалась менее чувствительной к облучению, чем остальные. При дозе 6 Гр GI-Sh, GI-F (TAp73/укороченные изоформы ≤ 1), GI-L (патогенная мутация в белке p53 и отсутствие TAp73) оказались более устойчивыми к рентгеновскому облучению, чем A172, GI-R и GI-Tr.

Таким образом, исследуемые глиобластомы имеют разный p53- и p73-статус, по-разному отвечают на радиотерапию γ - и рентгеновским об-

лучением и могут быть использованы как модели для подбора доз облучения и тестирования сенсibiliзирующих агентов.

Мутации в гене KRAS. Перспективным направлением для лечения глиобластом является иммунотерапия. В 57% глиобластом наблюдаются амплификация гена рецептора эпидермального фактора роста (EGF) [35, 36] и увеличение уровней его экспрессии на мембране клетки. Использование антител как против самого рецептора, так и против EGF могло бы стать перспективной терапевтической схемой лечения глиобластом. Белок KRAS (член семейства RAS-белков) активируется при присоединении EGF к рецептору и дезактивируется после расщепления связанной с ним молекулы GTP, прерывая прохождение сигнала. Замена в 12 и 13 кодонах гена KRAS, кодирующих глицин, единственную аминокислоту без боковых радикалов на любую аминокислоту приводит к нарушению пространственной конформации белка и препятствует его инактивации. В результате каскад EGF остается активным не зависимо от статуса рецептора и это делает невозможным проведение иммунотерапии, связанной с EGF и EGFR. Выбранные праймеры охватывали области 12–13 кодонов. Ни в одной из исследованных глиобластом не было выявлено замен в 12-м и 13-м глицинах. Таким образом, G1–R, G1–Tr, G1–L, G1–Sh, G1–C, G1–F могут быть использованы как модели для исследования и оптимизации иммунотерапии, связанной с EGF и его рецептором.

Экспрессия РНК генов VEGF-A и VEGFR-1 и белка VEGFR-1. Другой мишенью для иммунотерапии глиобластом являются фактор роста эндотелия сосудов и его рецептор 1 типа. В [6] было отмечено, что в глиобластомах G1–R и G1–Tr присутствует высокая активность ростовых факторов TGFβ1, VEGF и FGF2(b). В настоящей работе оценили экспрессию РНК генов VEGF-A и VEGFR-1 во всех исследуемых глиобластомах и обнаружили, что ее уровень выше, чем в клеточной линии A172 (рис. 3а). Для G1–Tr и G1–C экспрессии РНК фактора и рецептора превышали соответствующие значения для A172 в 2–5 раз. В G1–Sh и G1–F экспрессия РНК рецептора была выше в 2.6 и 13.2 раза, при этом значительно возростала и экспрессия РНК VEGF-A в 11.1 и 44.2 раза соответственно. В G1–L заметно возрастали уровни экспрессии РНК как рецептора (в 20.8 раза), так и фактора (в 352.4 раза). В G1–R, наоборот, значительно возростала экспрессия РНК гена VEGFR-1 (в 178.5 раза) при повышении экспрессии РНК фактора в 4.3 раза относительно A172.

Интересно, что в не опухолевых клетках, таких как HEK-293 и DF-2, экспрессия РНК гена VEGFR-1 выше, чем экспрессия РНК самого фактора.

В исследованных глиобластомах только в G1–R наблюдалось такое же соотношение, в остальных пяти опухолевых культурах экспрессия фактора VEGF-A значительно превышала экспрессию его рецептора. Таким образом, исследуемые глиобластомы различаются по уровням экспрессии РНК генов VEGF-A и VEGFR-1 и их соотношений между собой.

С помощью цитометрических измерений для глиобластом A172 и G1–Tr оценили уровни экспрессии белка VEGFR-1 и соотношение его рецепторной и растворимой форм (рис. 3б). В G1–Tr экспрессия общего белка и рецепторной формы VEGFR-1 была выше, чем в A172. При этом в G1–Tr в рецепторной форме на мембране клетки находились 42 и 54% белка VEGFR-1 (при окрашивании антителами к VEGFR-1 клонов 3B12 и 4C1 соответственно), а в A172 66 и 71% соответственно.

Иммунотерапия. Тестирование иммунотерапевтической схемы лечения с использованием антител клонов 4C1 и 3B12 к рецептору VEGFR-1 проводили на культурах A172 и G1–Tr с помощью оценки клеточного роста в реальном времени на приборе xCELLigence (рис. 3в). Клеточная линия A172 оказалась не чувствительной к иммунотерапии авастинном и моноклональными антителами к VEGFR-1. Напротив, выживаемость G1–Tr снизилась на 50% при обработке клеток авастинном. При использовании антител к VEGFR-1 клона 3B12 выживаемость клеток снизилась до 10%, а при использовании антител клона 4C1 упала ниже 5%. Совместное применение авастина и антител к VEGFR-1 клона 4C1 привело к полному подавлению роста клеток глиобластомы G1–Tr. Таким образом, G1–Tr может быть использована как модель тестирования схем иммунологической терапии, направленной на блокирование фактора роста эндотелия сосудов и его рецептора 1 типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описанные культуры глиобластом G1–R, G1–Tr, G1–L, G1–Sh, G1–C, G1–F являются стабильно культивируемыми клеточными линиями, отличающимися друг от друга размерами и формой клеток, p53- и p73-статусами, а также уровнями экспрессии РНК генов фактора роста эндотелия сосудов и его рецептора 1 типа. Все это делает описанные клеточные линии перспективными моделями для исследования формирования устойчивости глиобластом к радиотерапии и для тестирования новых сенсibiliзирующих агентов. Кроме того, описанные линии глиобластом могут быть использованы как модели для тестирования синтетических антител против VEGFR-1 и разработки схем иммунотерапии, направленной на блокирование VEGF и его рецептора.

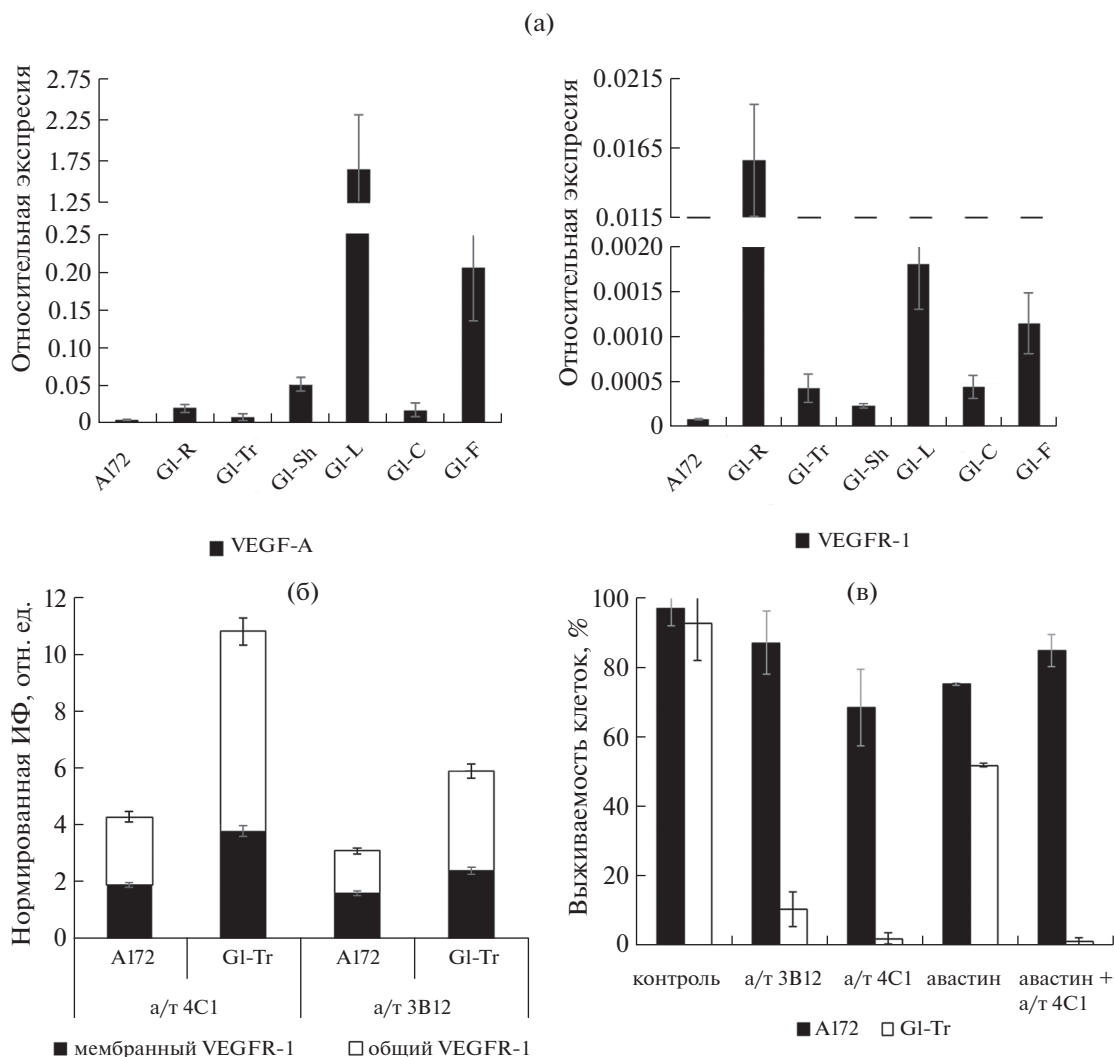


Рис. 3. Иммунотерапия глиобластом. Уровень экспрессии мРНК VEGF-A и VEGFR-1 в клетках линий A172, GI-R, GI-Tr, GI-L, GI-Sh, GI-C, GI-F по данным ОТ-ПЦР в реальном времени (а). Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии общего белка VEGFR-1 и его рецепторной формы, находящейся на мембране клеток линий A172 и GI-Tr. Данные проточной цитометрии по визуализации VEGFR-1 моноклональными антителами 4C1 и 3B12 (б). Выживаемость клеток линий A172 и GI-Tr при инкубации в присутствии моноклональных антител к VEGFR-1 человека 4C1 или 3B12, препарата Авастин, связывающего VEGF-A и их комбинации (в).

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 075-15-2021-1360) и в рамках государственного задания (регистрационный номер № 121060200125-2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tran N.H., Ryzhov V., Volnitskiy A. et al. // Cells. Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. P. 15150. <https://doi.org/10.3390/ijms242015150>
2. Le Rhun E., Preusser M., Roth P. et al. // Cancer Treat. Rev. 2019. V. 80. P. 101896. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.101896>
3. Osborn A.G., Louis D.N., Poussaint T.Y. et al. // Am. J. Neuroradiol. 2022. V. 43. № 7. P. 928. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A7462>
4. Yang K., Wu Z., Zhang H. et al. // Mol. Cancer. 2022. V. 21. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01513-z>
5. Landré V., Antonov A., Knight R., Melino G. // Oncotarget. 2016. V. 7. № 11. P. 11785. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7600>
6. Киселева Л.Н., Карташев А.В., Вартамян Н.Л. и др. // Цитология. 2017. Т. 59. № 10. С. 669. <https://doi.org/10.1134/S1990519X18010108>
7. Yan H., Parsons D.W., Jin G. et al. // N. Engl. J. Med. 2009. V. 360. № 8. P. 765. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808710>
8. McNamara M.G., Sahebjam S., Mason W.P. // Cancers. 2013. V. 5. № 3. P. 1103. <https://doi.org/10.3390/cancers5031103>

9. Ludwig K., Kornblum H.I. // J. Neurooncol. 2017. V. 134. P. 505.
<https://doi.org/10.1007/s11060-017-2379-y>
10. Kennedy M.C., Lowe S.W. // Cell Death Differ. 2022. V. 29. № 5. P. 983.
<https://doi.org/10.1038/s41418-022-00989-y>
11. Ghosh M., Saha S., Bettke J. et al. // Cancer Cell. Int. 2021. V. 39. № 4. P. 494.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.01.003>
12. England B., Huang T., Karsy M. // Tumor Biol. 2013. V. 34. P. 2063.
<https://doi.org/10.1007/s13277-013-0871-3>
13. Zambetti G.P. // Cell Death Differ. 2014. V. 21. № 4. P. 505.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2014.13>
14. Dötsch V., Bernassola F., Coutandin D. et al. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2010. V. 2. № 9. P. a004887.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004887>
15. Chen Y., Wang Y., He Q. et al. // Cancer Med. 2021. V. 10. № 13. P. 4644.
<https://doi.org/10.1002/cam4.4016>
16. Deyoung M.P., Ellisen L.W. // Oncogene. 2007. V. 26. № 36. P. 5169.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210337>
17. Engelmann D., Meier C., Alla V. et al. // Oncogene. 2015. V. 34. P. 4287.
<https://doi.org/10.1038/onc.2014.365>
18. Cam M., Charan M., Welker A.M. et al. // J. Neurooncol. 2020. V. 22. № 3. P. 345.
<https://doi.org/10.1093/neuonc/noz190>
19. Mazor G., Levin L., Picard D. et al. // Cell Death Dis. 2019. V. 10. № 3. P. 246.
<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1477-5>
20. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. // Nat. Med. 2003. V. 9. P. 669.
21. Friedman H.S., Prados M.D., Wen P.Y. et al. // J. Clin. Oncol. 2009. V. 27. P. 4733.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.8721>
22. Roskoski R.Jr. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008. V. 75. № 3. P. 287.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.121>
23. Ceci C., Atzori M.G., Lacal P.M., Graziani G. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 4. P. 1388.
<https://doi.org/10.3390/ijms21041388>
24. Atzori M.G., Tentori L., Ruffini F. et al. // J. Exp. Clin. Cancer Res. 2017. V. 36. № 1. P. 1.
<https://doi.org/10.1186/s13046-017-0577-2>
25. Волницкий А.В., Виноградская Г.Р., Филатов М.В. // Вопросы онкологии. 2012. Т. 58 № 4. С. 545.
26. Wilhelm M.T., Ruffini A., Wetzell M.K. et al. // Genes Dev. 2010. V. 24. P. 549.
<https://doi.org/10.1101/gad.1873910>
27. Balss J., Meyer J., Mueller W. et al. // Acta Neuropathol. 2008. V. 116. P. 597.
<https://doi.org/10.1007/s00401-008-0455-2>
28. Masciari S., Dewanwala A., Stoffel E.M. et al. // Genet. Med. 2011. V. 13. № 7. P. 651.
<https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e31821628b6>
29. Ørsted D.D., Bojesen S.E., Tybjerg-Hansen A., Nordestgaard B.G. // J. Exp. Med. 2007. V. 204. № 6. P. 1295.
<https://doi.org/10.1084/jem.20062476>
30. Hoyos D., Greenbaum B., Levine A.J. // Cell Death Differ. 2022. V. 29. № 5. P. 938.
<https://doi.org/10.1038/s41418-022-00980-7>
31. Sailaja K., Rao V.R., Yadav S. et al // J. Nat. Sci. Biol. Med. 2012. V. 3. № 2. P. 182.
<https://doi.org/10.4103/0976-9668.101910>
32. Cheng C., Feng S., Jiao J. et al. // Am. J. Cancer Res. 2018. V. 8. № 7. P. 1200.
33. Mikulenkova E., Neradil J., Zitterbart K. et al. // Tumor Biol. 2015. V. 36. P. 7483.
<https://doi.org/10.1007/s13277-015-3474-3>
34. Ugur H., Sayan A.E., Ozdamar S.O. et al. // Oncol. Rep. 2004. V. 11. № 6. P. 1337.
35. An Z., Aksoy O., Zheng T. et al. // Oncogene. 2018. V. 37. № 12. P. 1561.
<https://doi.org/10.1038/s41388-017-0045-7>
36. Del Vecchio C.A., Giacomini C.P., Vogel H. et al. // Oncogene. 2013. V. 32. № 21. P. 2670.
<https://doi.org/10.1038/onc.2012.280>