

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КАНЦЕРОГЕНЕЗА ФГБУ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА»
МИНЗДРАВА РОССИИ

ISSN: 2313-805X (Print)
ISSN: 2413-3787 (Online)

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

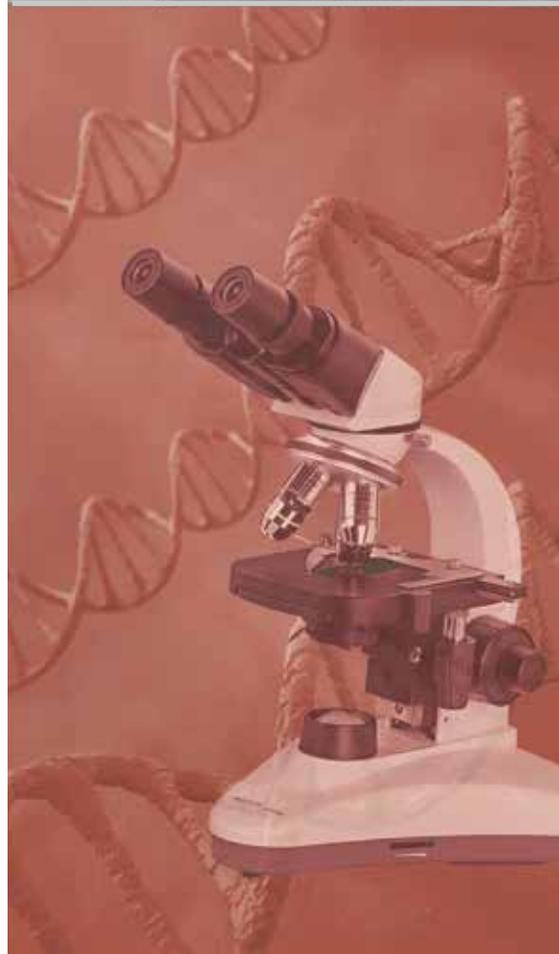
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



МАТЕРИАЛЫ

*IV Всероссийской конференции
по молекулярной онкологии*

17–19 декабря 2018 г., Москва



ТОМ 5 № 4
2018

ПРИЛОЖЕНИЕ

мембраны соответственно. На сегодняшний день задача селективного выделения различных классов везикул остается нерешенной прежде всего за счет «перекрытия» ЭКВ по размерам, плотности и морфологии. В связи с этим поиск специфических маркеров, позволяющих разделять экзосомы и МВ, является актуальной задачей. Ряд белков, включая тетраспанины (CD9, CD81, CD63) и некоторые белки липидных рафтов (флотиллины), принято считать маркерами экзосом, однако их селективность вызывает большие вопросы. При этом направленного сравнения экзосомальных маркеров в 2 типах ЭКВ практически не проводилось, за исключением единичных работ, где показано присутствие некоторых тетраспанинов в обоих типах ЭКВ.

В данной работе мы сравнили присутствие маркеров экзосом (CD9, флотиллин-1 (Flot-1) и флотиллин-2 (Flot-2)) в различных фракциях ЭКВ, полученных из кондиционированной среды клеток НМРЛ (A549, H1299, H460), а также из плазмы крови пациентов с НМРЛ и здоровых доноров. В тех же образцах анализировали белок стоматин. ЭКВ выделяли методом дифференциального ультрацентрифугирования, разделяя фракции, соответствующие среднему размеру МВ (осаждение при 20 000 xg 1,5 ч) и экзосом (100 000 xg, 3 ч). Плазму крови предварительно разводили в натрий-фосфатном буфере 1:3, клетки культивировали в среде DMEM с фетальной сывороткой, предварительно очищенной от ЭКВ. Количество частиц и качество препаратов оценивали методом анализа траектории движения наночастиц (NTA) и с помощью просвечивающего электронного микроскопа. Анализ белков проводили методом иммуноблоттинга.

Результаты показали, что все исследуемые белки-маркеры экзосом представлены на высоком уровне в обеих фракциях ЭКВ как плазмы крови, так и кондиционированной среды, причем в сопоставимых количествах. Соотношение уровней Flot-1, Flot-1 и CD9 в экзосомах и МВ отличалось для разных линий клеток и варьировало в образцах плазмы крови. Присутствие стоматина в экзосомах и МВ ранее было показано лишь для ретикулоцитов и эритроцитов, а также при некоторых лейкозах. Нами впервые обнаружено, что этот белок представлен на высоком уровне в экзосомах и МВ всех исследуемых клеток НМРЛ, плазмы крови пациентов и здоровых доноров, причем уровень стоматина в препаратах экзосом был существенно выше, чем в образцах МВ. Таким образом, экзосомальные маркеры CD9, Flot-1 и Flot-2 не могут быть использованы для дифференциации экзосом и МВ. Стоматин является, по-видимому, универсальным компонентом ЭКВ и может быть рекомендован в качестве маркера, причем более селективного в отношении экзосом по сравнению с исследованными маркерами.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 18-04-00038А).

Сравнительное изучение детерминант Wnt/ β -катенин-каскада в CD133⁺-опухолевых стволовых клетках и CD133⁻-дифференцированных клетках мультиформной глиобластомы для поиска потенциальных терапевтических мишеней

В. Е. Шевченко, Ю. Д. Василец, Н. Е. Арноцкая
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава
России, Москва

Введение. Мультиформная глиобластома (МГБ) является первичной злокачественной опухолью мозга с крайне неблагоприятным прогнозом, который связывают с существованием CD133⁺-стволовых клеток глиобластомы (СКГ), ответственных за резистентность к терапии и рецидив опухоли. СКГ способны к самообновлению, пролиферации, дифференцировке, образованию опухоли головного мозга при их трансплантации иммунодефицитным мышам. Изучение внутриклеточных сигнальных путей, которые регулируют стволовость и туморогенность СКГ, позволит разработать более эффективные подходы к лечению пациентов с МГБ.

Задачи исследования. Сравнительное изучение детерминант Wnt/ β -катенин-каскада в CD133⁺-СКГ и CD133⁻-дифференцированных клетках МГБ для поиска потенциальных терапевтических мишеней заболевания.

Материалы и методы. Использовали CD133⁺-СКГ и CD133⁻-дифференцированные клетки, полученные иммуносортингом по маркеру CD133⁺ из глиомасфер культуры клеточной линии глиобластомы человека U87MG. Сравнительное изучение клеточных протеомов проводили методом нано-высокоэффективной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии.

Результаты. В клеточных лизатах в целом идентифицировано 1990 белков. Экспрессия 11 белков Wnt-каскада (CACYPB, CSNK2A2, CSNK2B, STBP1, STBP2, CTNBN1, CTNNA1, CUL1, RAC2, RHOA, RUVBL1) увеличена более чем в 2 раза в протеоме CD133⁺-СКГ по сравнению с CD133⁻-дифференцированными клетками МГБ. Кроме того, обнаружена повышенная экспрессия 7 белков (CCAR2, PSMA1, PSMA3, PSMB5, PSMD1, PSMD10, PSMD13), которые положительно регулируют активность Wnt/ β -катенин-каскада.

Выводы. Активность Wnt/ β -катенин-каскада значительно повышена в CD133⁺-СКГ по сравнению с CD133⁻-дифференцированными клетками МГБ, что указывает на важную роль данного каскада в патогенезе МГБ. По нашему мнению, таргетирование

Wnt/ β -катенин-каскада в СКГ является чрезвычайно важным аспектом терапии МГБ.

Действие гипоксии на секретом клеточной линии U-251 мультиформной глиобластомы

В. Е. Шевченко, Т. И. Кушнир, И. А. Кудрявцев,
Н. Е. Арноцкая

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава
России, Москва

Введение. Мультиформная глиобластома (МГБ) характеризуется целым рядом процессов, приводящих к прогрессированию заболевания: увеличенной инвазией, резистентностью к химио- и радиотерапии, иммуносупрессией, рецидивированием. Все эти изменения, включая еще и геномную нестабильность, потерю апоптотического потенциала, экспрессию онкогенов и аномальный ангиогенез, опосредованы действием гипоксии. Преимущество изучения секрета перед протеомом клеток заключается в том, что секретируемые белки могут входить в состав лиганд-рецепторных комплексов и представлять значительный интерес для поиска потенциальных терапевтических мишеней.

Задачи исследования. Изучить действие гипоксии на секретом клеточной линии U-251 МГБ для поиска потенциальных терапевтических мишеней.

Материалы и методы. Методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения исследовали секретомы клеточной линии U-251 МГБ, культивируемые в условиях гипоксии и нормоксии.

Результаты. Идентифицированные протеины показали достаточно высокую частоту «перекрытия» для 2 клеточных популяций: 816 (61 %) белков детектировались во всех клеточных секретоммах, 317 (24 %) белков – только в клетках U-251 при нормоксии, и 209 (15 %) белков были уникальными для клеток U-251 после действия гипоксии. Среди 1342 идентифицированных белков статистически значимые изменения в экспрессии ($p < 0,05$) зарегистрировали для 390 белков; 343 протеина изменяли экспрессию более чем в 2 раза: 153 – увеличивали, а 190 – уменьшали. Повышение экспрессии более чем на 2 порядка наблюдали у 11 протеинов: S100A6, HEY1, ZIP3, BAG6, ATP11A, S100A4, BAZ2B, ZNF350, PSMA1, SORCS3, ZEB2.

Выводы. Гипоксия существенно влияет на секретом опухолевых клеток МГБ. Роль 7 дифференциально экспрессированных протеинов (S100A6, HEY1, ZIP3, BAG6, S100A4, ZEB2, TRPM1) ранее доказана в патогенезе МГБ, что указывает на возможность их использования в качестве потенциальных терапевтических мишеней или биомаркеров при лечении этого заболевания.