

УДК 576.385.5

## РЕКОМБИНАНТНЫЙ АНАЛОГ БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА SLURP-1 ТОРМОЗИТ РОСТ МУЛЬТИКЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ ИЗ КЛЕТОК КАРЦИНОМ

М. Л. Бычков<sup>1</sup>, М. А. Шулепко<sup>1,\*</sup>, О. В. Шлепова<sup>1,2</sup>,  
Е. Н. Люкманова<sup>1,2,\*\*</sup>, академик РАН М. П. Кирпичников<sup>1,3</sup>

Поступило 26.07.2019 г.

Показано, что рекомбинантный аналог белка SLURP-1 эффективно останавливает рост 3D-моделей опухолей — мультиклеточных сфероидов, полученных из клеток карциномы кожи человека A431 и аденокарциномы лёгкого человека A549. Совместное применение препарата SLURP-1 с гефитинибом (ингибитор рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR)) приводит к аддитивному антипролиферативному эффекту на сфероиды из клеток A431. Полученные данные свидетельствуют о возможности создания первого в своём классе противоопухолевых средств на основе рекомбинантного SLURP-1.

**Ключевые слова:** никотиновый ацетилхолиновый рецептор, рак, эпителий, Lуб/uPAR, пролиферация.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524895517-520>

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор — лигандозависимый ионный канал экспрессируется как в нейронах и нейромышечных окончаниях, так и в эпителиальных клетках и играет важную роль в межклеточной сигнализации. Активация этого рецептора альфа 7 типа ( $\alpha 7$ -nAChR) ацетилхолином и никотином приводит к запуску внутриклеточных сигнальных путей, регулирующих гомеостаз клеток эпителия. Одним из механизмов, лежащих в основе развития и прогрессии карцином лёгкого, желудка, толстой кишки, молочной железы и др., вызванных табакокурением, является активация  $\alpha 7$ -nAChR никотином и его производными, содержащимися в табачном дыме, — нитрозаминами [1]. Активация  $\alpha 7$ -nAChR может стимулировать передачу сигналов через рецепторы эпидермального фактора роста и эндотелиального фактора роста сосудов, а также  $\beta$ -адренергические рецепторы, которые, в свою очередь, активируют митогенные, антиапоптозные и пролиферативные пути [2]. Также  $\alpha 7$ -nAChR участвует в регуляции миграции и инвазии опухолевых клеток, а также ангиогенеза в опухолевой массе [3]. Модуляция nAChR считается перспективным на-

правлением противоопухолевой терапии, а поиск новых модуляторов является актуальной задачей современной медицины [4].

$\alpha$ -Нейротоксины яда змей необратимо блокируют  $\alpha 7$ -nAChR в наномолярных концентрациях и эффективно останавливают рост опухолей *in vivo* [5]. Однако эти белки обладают высокой летальной токсичностью и не подходят в качестве противоопухолевых агентов.

Секретируемый белок человека SLURP-1, структурный гомолог  $\alpha$ -нейротоксинов, экспрессируется в эпителии, участвует в процессах регуляции пролиферации и дифференцировки кератиноцитов и является ауто/паракринным регулятором [6]. Экспрессия гена *SLURP-1* снижена в клетках меланомы, и это снижение коррелирует со стадией заболевания [7]. Снижение экспрессии *SLURP-1* наблюдается при раке кишечника [8] и лёгкого [9], а также в кератиноцитах при онкогенной трансформации, индуцированной нитрозаминами [10]. Онкогенный эффект нитрозаминов отменяется при предварительной инкубации кератиноцитов с рекомбинантным препаратом SLURP-1 [11]. Кроме того, SLURP-1 подавляет миграцию и инвазию клеток рака поджелудочной железы. Повышенная концентрация SLURP-1 в крови пациентов с раком поджелудочной железы (PDAC) коррелирует с большей продолжительностью жизни после хирургического удаления первичной опухоли [12].

Ранее авторами было показано, что рекомбинантный аналог SLURP-1, отличающийся от природного белка наличием N-концевого остатка метионина

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии  
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской Академии наук, Москва

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт  
(национальный исследовательский университет),  
Долгопрудный Московской обл.

<sup>3</sup> Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова

\*E-mail: [mikhailshulepko@gmail.com](mailto:mikhailshulepko@gmail.com)

\*\*E-mail: [ekaterina-lyukmanova@yandex.ru](mailto:ekaterina-lyukmanova@yandex.ru)

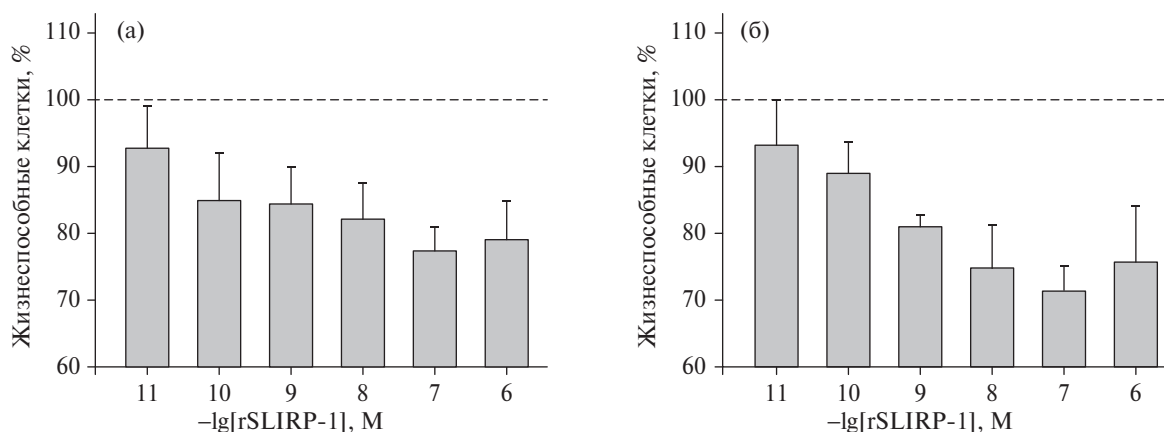
(rSLURP-1), является селективным негативным аллостерическим модулятором  $\alpha 7$ -nAChR [13]. На ряде клеточных линий карцином человека показано, что rSLURP-1 ингибирует рост раковых клеток *in vitro* [14]. Однако поведение клеток в монослое значительно отличается от поведения клеток в объёмных опухолях, являющихся более устойчивыми к химиотерапевтическим веществам, чем клетки в монослое [15]. В настоящей работе впервые изучен эффект rSLURP-1 на 3D-моделях опухолей — мультиклеточных сфероидов, полученных из клеток карциномы кожи (меланомы) человека A431 и аденокарциномы лёгкого человека A549.

Мультиклеточные сфероиды без некротического ядра были получены из клеток аденокарциномы лёгкого A549 и эпидермальной карциномы A431. Клетки культивировали в питательной среде DMEM с добавлением 10% (по объёму) эмбриональной бычьей сыворотки, 2 мМ глутамин, 25 мМ HEPES и пересевали минимум 2 раза в неделю. Для получения сфероидов клетки высевали в обработанный полигидроксиметилакрилатной матрицей 96-луночный круглодонный планшет (15000 клеток на лунку 96-луночного планшета) и культивировали в течение 48 ч. После этого сфероидам меняли культуральную среду, добавляли rSLURP-1 в различных концентрациях либо 10 нМ бортезомиба, 1 мкМ gefitinib и 1 мкМ доксорубин и инкубировали в течение 48 ч. Влияние rSLURP-1 на жизнеспособность сфероидов изучали при помощи теста на активность митохондриальной сукцинатдегидрогеназы (MTT-тест). К сфероидам добавляли MTT (конечная концентрация 0,25 мг/мл), инкубировали 4 ч, при этом MTT восстанавливался до нерастворимого формазана. Затем формазан растворяли в изопропанол с добавлением 75 мМ

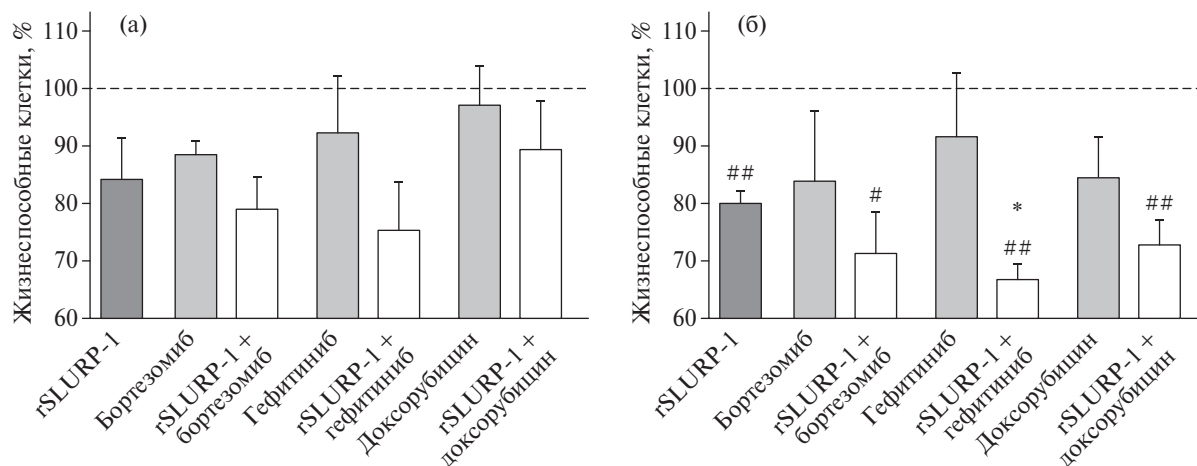
HCl и определяли поглощение в лунках при 540 нм с выравниванием на фон при 655 нм с помощью планшетного ридера Bio-Rad 680.

Инкубация сфероидов из клеток A549 и A431 с препаратом rSLURP-1 в концентрации 1 мкМ в течение 48 ч приводила к значительному уменьшению количества клеток до  $80,3 \pm 2,7\%$  и до  $74,6 \pm 3,2\%$  от контрольного уровня соответственно (рис. 1а). Снижение концентрации rSLURP-1 в 100 раз сохраняло ингибирующий эффект препарата примерно на том же уровне. Дальнейшее снижение концентрации rSLURP-1 постепенно возвращало число жизнеспособных клеток к контрольному уровню (рис. 1а). Так как клетки A431 экспрессируют на своей поверхности в 2,2 раза больше функциональных  $\alpha 7$ -nAChR по сравнению с клетками A549 [14], сравнивая эффективность rSLURP-1 по отношению к сфероидам из клеток A431 и A549 говорит об отсутствии прямой корреляции между уровнем экспрессии функциональных  $\alpha 7$ -nAChR на поверхности клеток сфероидов и их чувствительностью к модулятору. Кроме того, стоит отметить более высокую активность rSLURP-1 на клетках A549 в монослое, чем в 3D-культуре (максимальное снижение числа жизнеспособных клеток до  $\sim 70,49 \pm 1,8\%$  в монослое). В случае клеток A431 эффективность препарата rSLURP-1 в монослое (максимальное снижение числа жизнеспособных клеток до  $\sim 68,3 \pm 17\%$ ) была сравнима с таковой на сфероидов.

Препарат rSLURP-1 в пониженной концентрации (1 нМ) был протестирован совместно с препаратами, применяемыми в настоящее время для противоопухолевой терапии: антибиотиком доксорубином, ингибитором EGFR gefitinib и ингибитором 26S субъединицы протеасом бортезоми-



**Рис. 1.** Влияние рекомбинантного SLURP-1 на рост сфероидов, полученных из клеток A549 (а) и A431 (б). Данные приведены как среднее  $\pm$  средноквадратичная ошибка ( $n = 3$ ). 100% жизнеспособных клеток соответствует необработанным клеткам.



**Рис. 2.** Влияние rSLURP-1 и химиотерапевтических веществ на рост сфероидов, полученных из клеток A549 (а) и A431 (б). Данные приведены как среднее  $\pm$  среднеквадратичная ошибка ( $n = 3$ ). # ( $p < 0,05$ ) и ## ( $p < 0,01$ ) указывают на достоверное отличие от контроля (100%) по одностороннему критерию Стьюдента; \* ( $p < 0,05$ ) означает достоверное отличие между группами “rSLURP-1” и “rSLURP-1 + химиотерапевтический препарат” по одностороннему тесту ANOVA с последующим Dunnett’s/hoc тестом. 100% жизнеспособных клеток соответствует необработанным клеткам.

бом. При инкубации в течение 48 ч 1 нМ rSLURP-1, 10 нМ бортезомиб, 1 мкМ гефитиниб или 1 мкМ доксорубин по отдельности ингибировали рост сфероидов из клеток A549 до  $84,03 \pm 7,3$ ;  $88,3 \pm 2$ ;  $92,3 \pm 9,7$  и  $96,8 \pm 6,8\%$  соответственно (рис. 2а). Совместная инкубация сфероидов из клеток A549 с rSLURP-1 и химиотерапевтическими препаратами в тех же концентрациях приводила к дополнительному снижению числа жизнеспособных клеток, однако ни в одном случае не наблюдалось значимого эффекта (рис. 2а). При инкубации сфероидов из клеток A431 в течение 48 ч с 1 нМ rSLURP-1, 10 нМ бортезомиба, 1 мкМ гефитиниба или 1 мкМ доксорубина наблюдалось торможение пролиферации клеток до  $80,0 \pm 2,0$ ;  $83,6 \pm 6,25$ ;  $91,3 \pm 11,2$  и  $84,4 \pm 6,8\%$  соответственно (рис. 2б). Совместное применение rSLURP-1 и бортезомиба, гефитиниба или доксорубина приводило к дальнейшему снижению числа жизнеспособных клеток до  $71,2 \pm 7,3$ ;  $66,5 \pm 3,0$  и  $72,7 \pm 4,2\%$  соответственно, достигая статистически значимого эффекта в случае гефитиниба (рис. 2б). Наблюдаемые аддитивные эффекты свидетельствуют о различных молекулярных мишенях противоопухолевых препаратов и rSLURP-1 в сфероидах и находятся в согласии с ранее обнаруженным на монослое клеток A431 аддитивным действием гефитиниба и модулятора [11]. По-видимому, в этом случае остановка роста объёмных опухолей достигается за счёт комбинированного действия rSLURP-1 и противоопухолевых препаратов на  $\alpha 7$ -nAChR и другие мишени. Стоит особо отметить, что в случае совместного применения rSLURP-1 и противоопухолевых препаратов в пониженной концен-

трации ингибирующий эффект сопоставим с максимальным антипролиферативным эффектом, наблюдаемым для 1 мкМ rSLURP-1, что позволяет снизить возможный токсичный эффект комбинированной терапии (рис. 1б).

Таким образом, впервые на 3D-моделях карцином человека показано, что rSLURP-1 эффективно ингибирует их рост. Продемонстрирована возможность совместного применения пониженной концентрации rSLURP-1 и химиотерапевтических препаратов для достижения максимального антипролиферативного эффекта, что указывает на перспективность препаратов на основе белка человека SLURP-1 в качестве прототипов нового поколения таргетных противоопухолевых препаратов.

**Источник финансирования.** Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект № 17–74–20161).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grando S.A. // Nat. Rev. Cancer. 2014. V. 14. P. 419–429. DOI: 10.1038/nrc3725.
2. Schaal C., Chellappan S.P. // Mol. Cancer Res. MCR. 2014. V. 12. P. 14–23. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0541.
3. Шуленко М.А., Кульбацкий Д.С., Бычков М.Л. и др. // Биоорг. химия. 2019. Т. 45 (3). С. 227–237. DOI: 10.1134/S1068162019020122.
4. Russo P., Cardinale A., Margaritora S., et al. // Life Sci. 2012. V. 91. P. 1087–1092. DOI: 10.1016/j.lfs.2012.05.003.
5. Grozio A., Paleari L., Catassi A., et al. // Int. J. Cancer. 2008. V. 122. P. 1911–1915. DOI: 10.1002/ijc.23298.

6. Васильева Н.А., Локтюшов Е.В., Бычков М.Л. и др. // Усп. биол. химии. 2017. Т. 57. С. 303–330. DOI: 10.1134/S0006297917130090.
7. Bergqvist C., Kadara H., Hamie L., et al. // Int. J. Dermatol. 2018. V. 57. P. 162–170. DOI: 10.1111/ijd.13850.
8. Pettersson A., Nylund G., Khorram-Manesh A., et al. // Auton. Neurosci. Basic Clin. 2009. V. 148. P. 97–100. DOI: 10.1016/j.autneu.2009.03.002.
9. Russo P., Cardinale A., Margaritora S., et al. // Life Sci. 2012. V. 91. P. 1087–1092. DOI: 10.1016/j.lfs.2012.05.003.
10. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Grando S.A. // Life Sci. 2007. V. 80. P. 2243–2247. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.01.003.
11. Kalantari-Dehaghi M., Bernard H.-U., Grando S.A. // Life Sci. 2012. V. 91. P. 1122–1125. DOI: 10.1016/j.lfs.2012.02.004.
12. Throm V.M., Männle D., Giese T., et al. // Oncotarget. 2018. V. 9. P. 11734–11751. DOI: 10.18632/oncotarget.24312.
13. Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Kudryavtsev D., et al. // PloS One. 2016. V. 11. P. e0149733. DOI: 10.1371/journal.pone.0149733.
14. Lyukmanova E., Bychkov M., Sharonov G., et al. // Br. J. Pharmacol. 2018. V. 175. P. 1973–1986. DOI: 10.1111/bph.14194.
15. Riedl A., Schleder M., Pudielko K., et al. // J. Cell Sci. 2017. V. 130. P. 203–218. DOI: 10.1242/jcs.188102.

## RECOMBINANT ANALOGUE OF THE HUMAN PROTEIN SLURP-1 INHIBITS THE GROWTH OF MULTICELLULAR CARCINOMA CELL SPHEROIDS

M. L. Bychkov<sup>1</sup>, M. A. Shulepko<sup>1</sup>, O. V. Shlepova<sup>1,2</sup>,  
E. N. Lyukmanova<sup>1,2</sup>, Academician of the RAS M. P. Kirpichnikov<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences,  
Moscow, Russian Federation*

<sup>2</sup>*Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny,  
Moscow Region, Russian Federation*

<sup>3</sup>*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

Received July 26, 2019

The present study showed that the recombinant analogue of SLURP-1 effectively inhibits the growth of a 3D model of tumors — multicellular spheroids from human epidermoid carcinoma A431 cells and human lung adenocarcinoma A549 cells. The combined application of SLURP-1 with gefitinib (inhibitor of epidermal growth factor receptor (EGFR)) leads to the synergistic antiproliferative effect on spheroids from A431 cells. The results obtained suggest the possibility for design of first-in-class anticancer drugs based on recombinant SLURP-1.

**Keywords:** nicotinic acetylcholine-receptor, cancer, epithelium, Ly6/uPAR, proliferation.