

© Якубович Е.И., Полищук А.Г., Евтушенко В.И., 2023
Вопросы онкологии, 2023. Том 69, № 3
УДК 616.61-006:575.1
DOI

Е.И. Якубович, А.Г. Полищук, В.И. Евтушенко

Экзогенная экспрессия протеинфосфатазы DUSP9 снижает скорость миграции клеток карциномы почки

ФГБУ «РНЦРХТ» Минздрава России, Санкт-Петербург

DUSP9/МКР-4 принадлежит к семейству биспецифических протеинфосфатаз, негативно регулирующих MAP-киназы (ERK, p38 и JNK). Исследования последнего десятилетия указывают на то, что DUSP9 может быть одной из мишеней для терапевтического воздействия на метастатическую форму карциномы почки. О значительном снижении уровня мРНК DUSP9 в клинических образцах КП, по сравнению с нормальной тканью, впервые сообщили Ю.В. Чебуркин и соавт. в 2002 г. [1] и в последующие годы многие другие исследовательские группы. Мы показали, что подавление экспрессии мРНК DUSP9 происходит уже на ранних стадиях карциномы почки, а экспрессия гена *DUSP9* может регулироваться на эпигенетическом уровне гендерно-зависимым образом.

Целью данной работы было изучение влияния экзогенной экспрессии гена *DUSP9* на пролиферацию и миграцию клеток карциномы почки человека.

Материалы и методы. В работе использовалась DUSP9-негативная линия карциномы почки человека ACHN. Трансфекцию клеток проводили сконструированным нами DUSP9-экспрессирующим вектором. Эффективность трансфекции оценивали методами иммунофлуоресценции и вестерн-блота, количество жизнеспособных клеток МТТ-тестом, скорость миграции клеток скрэтч-тестом. Внеклеточные везикулы из кондиционной среды выделяли, используя SubX™ технологию, и характеризовали методом анализа траекторий наночастиц и вестерн-блотом.

Результаты. Эффективность трансфекции варьировала от 70 % до 90 %. Количество жизнеспособных клеток, экспрессирующих DUSP9, и клеток, трансфицированных вектором без вставки, различалась незначительно 48 ч. после трансфекции. Экспрессия DUSP9 статистически значимо уменьшала скорость миграции клеток по сравнению с контролем. Белок DUSP9 обнаруживался в экзосомной

фракции бессывороточной кондиционной среды от клеток, трансфицированных DUSP9-экспрессирующим вектором.

Выводы. Мы показали, что экзогенная экспрессия DUSP9 замедляет миграцию клеток карциномы почки. Результат указывает на то, что одной из возможных ролей DUSP9 в канцерогенезе почки может быть регулирование процесса метастазирования.

Ключевые слова: DUSP9/МКР-4 протеинфосфатаза; карцинома почки; пролиферация и миграция клеток; метастазирование

Для цитирования: Якубович Е.И., Полищук А.Г., Евтушенко В.И. Экзогенная экспрессия протеинфосфатазы DUSP9 снижает скорость миграции клеток карциномы почки. Вопросы онкологии. 2023;69(3):00–00. doi:

Введение

Исследования последнего десятилетия указывают на то, что протеинфосфатаза двойной специфичности DUSP9 (dual specificity phosphatase 9), также известная как МКР-4 (митоген-активируемая протеинкиназа [MAPK] фосфатаза-4 mitogen-activated protein kinase [MAPK] phosphatase 4), может быть одной из мишеней для терапевтического воздействия на метастатическую форму карциномы почки (КП). Впервые DUSP9 была описана швейцарской группой исследователей в 1997 г. [2].

DUSP9 принадлежит к семейству протеинфосфатаз, негативно регулирующих ERK1/2, p38 и JNK MAP-киназы, дефосфорилируя их как по тирозиновым, так и по серин/треониновым остаткам. На 2021 г. в человеческом геноме выявлена 61 протеинфосфатаза такого типа [3].

В 2002 г. Ю.В. Чебуркин и соавт. впервые сообщили о значительном снижении уровня мРНК гена *DUSP9* в образцах опухолей почки, по сравнению с прилегающей нормальной тканью. Снижение экспрессии было обнаружено с помощью технологии кДНК-микрочипов и подтверждено Нозерн-блотом на 34 парных образцах [1].

Позднее Е.И. Якубович и соавт. получили такой же результат, проанализировав 26 парных образцов нормальной и опухолевой ткани почки разных гистологических типов методом обратной транскрипции, сопряженной с ПЦР (ОТ-ПЦР). Авторы показали, что подавление экспрессии гена *DUSP9* происходит уже на ранних стадиях заболевания [4]. В 2010 г. о снижении уровня мРНК гена *DUSP9* в светлоклеточной карциноме (СКК) также сообщили китайские исследователи, проанализировав 10 парных образцов [5]. Год спустя подавление экспрессии *DUSP9* на мРНК и белковом уровнях в СКК было дополнительно подтверждено количественной ОТ-ПЦР на 46 парных образцах и иммуногистохимическим анализом на 107 парных образцах [6]. В этой же работе было показано, что снижение экспрессии *DUSP9* коррелирует с плохой общей выживаемостью пациентов и более высокой степенью злокачественности опухоли. И наконец, в 2020 г. значительное снижение уровня мРНК гена *DUSP9* в почечно-клеточной карциноме было подтверждено при анализе данных (из UALCAN базы данных онкологического института Даны Фарбер, США) по экспрессии гена *DUSP9* в 533 опухолевых и 72 нормальных образцах почки человека [7]. Таким образом, подавление экспрессии *DUSP9* в почечно-клеточной карциноме зафиксировано несколькими исследовательскими группами, использовавшими различные методы анализа на большом количестве клинического материала. Характерно, что снижение экспрессии гена *DUSP9* наблюдалось более, чем в 95 % исследованных опухолевых образцов и было 20-80-ти кратное. Такое значительное супрессирование активности гена в практически всех опухолевых образцах указывает на его ключевую роль в процессе онкогенеза почки. Онкосупрессорные свойства *DUSP9* продемонстрированы и с использованием различных экспериментальных *in vitro* и *in vivo* моделей [8–10].

Кроме опухолей почки, снижение экспрессии *DUSP9* обнаружено в клинических образцах рака желудка и колоректального рака [8, 9]. В случае гепатоцеллюлярной карциномы получены неоднозначные результаты — одна исследовательская группа сообщила о подавлении, а другая, наоборот, об увеличении экспрессии *DUSP9* в опухолевых образцах [11, 12].

О роли и механизмах регуляции *DUSP9* в опухолях человека, в том числе и в опухоли почки, известно мало. Нами показано, что подавление экспрессии *DUSP9* в клетках КП может осуществляться на эпигенетическом уровне гендерно-зависимым образом [13]. Позже гиперметилирование промотора *DUSP9* было выявлено в клинических образцах колоректальной карциномы и карциномы желудка [8, 9]. Мы также выя-

вили связь транскрипционной активности *DUSP9* с определенными модификациями гистона H3 в локусе гена, что свидетельствует о возможном вовлечении процесса модификации гистонов в регулирование активности гена *DUSP9* [14]. Кроме эпигенетических, активность *DUSP9* в опухолях человека может регулироваться на транскрипционном и пост-транскрипционном уровнях [3].

В данной работе мы попытались выяснить, влияет ли экспрессия *DUSP9* на пролиферацию и миграцию клеток КП человека.

Материалы и методы

Исследование одобрено этическим комитетом по этике ФГБУ «РНЦПХТ» Минздрава России, протокол № 01-06/2021 от 1 июня 2021 г.

Клеточная линия. В работе использовалась клеточная линия КП человека ACHN, полученная из опухолевых клеток плеврального выпота пациента с метастатическим раком почки (ATCC®CRL-1611™, ООО Биолот). Клетки культивировались в питательной среде (ПС) Игла MEM (Биолот) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (FCS, Sigma) и смеси 100 Ед/мл пенициллина/100 мкг/мл стрептомицина (Sigma).

Трансфекция. Процесс конструирования экспрессионной плазмиды, несущей ген *DUSP9*, описан нами ранее [15]. Трансфекцию клеток проводили в 96-луночном планшете липофектаминоном 3000 (Invitrogen) в соответствии с инструкцией производителя. Эффективность трансфекции определяли как долю клеток, экспрессирующих EGFP от общего количества клеток в полях обзора, используя систему IN Cell Analyzer 2000 (GE).

Иммуноцитохимическая окраска клеток. Клетки фиксировались в 10 % формалине (Астромед), отмывались в 1xPBS (фосфатно-буферный раствор, Биолот) и пермеабелизовались в смеси 0,2 % тритон X-100/1xPBS. Неспецифические белки блокировались 1 % BSA (бычий альбумин, фракция V, Sigma)/1xPBS (трижды по 10 мин при комнатной температуре (КТ)). Затем клетки инкубировались ночь при +4 °C с кроличьими антителами к белку *DUSP9* (Ab167080, Abcam), отмывались от несвязавшихся антител в 1 % BSA/1x PBS и инкубировались с козьими антителами к кроличьему IgG, конъюгированными с Alexa Fluor 647 (Ab 150083, Abcam). После отмывки от несвязавшихся козьих антител в 1xPBS, ядра клеток окрашивались DAPI. Затем клетки визуализировались с помощью системы IN Cell Analyzer 2000.

Вестерн-блот анализ. Экспоненциально растущие клетки лизировали в RIPA буфере, содержащем 150 мМ NaCl, 50 мМ трис-HCl, pH 7.5, 1мМ ЭДТА, 1 % ТритонX-100, 0,1 % SDS и Halt™ Protease Inhibitor Cocktail. Все реагенты из ThermoFisher. Белки супернатанта разделяли в денатурирующем 10 % SDS/полиакриламидном геле и переносили на PVDF мембрану (Amersham Hybond P, GE Healthcare) в трис-глициновом буфере с метанолом (25 мМ трис, 192 мМ глицин, 20 % метанол (pH 8.3)). Неспецифические сайты связывания антител блокировали путем инкубации мембраны в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 0,1 % Tween 20, 5 % BSA, после чего мембрану инкубировали в течение ночи при +4 °C с кроличьими антителами к исследуемому белкам. После отмывки от несвязавшихся первичных антител мембраны инкубировались с козьими антителами к кроличьему IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (ab205718). Комплексы антиген-антитело детектировались с использованием SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (ThermoFisher).

Оценка скорости пролиферации клеток. Количество жизнеспособных клеток оценивали по метаболической активности клеток, используя МТТ-тест [16]. Для этого ПС в лунках 96-луночного планшета заменялась на раствор МТТ (Sigma Aldrich) в ПС в концентрации 100 мкг/мл. После 1,5 часа инкубации планшета в CO₂-инкубаторе, МТТ удалялся и к клеткам с образовавшимися кристаллами формазана добавлялся 100 % DMSO (Serva). После растворения кристаллов измерялась оптическая плотность в лунках в микропланшетном ридере при длинах волн 540 и 650 нм. Количество метаболизирующих клеток оценивали по значениям оптической плотности.

Оценка скорости миграции клеток. Для оценки миграционной активности клеток использовали тест заживления повреждения в монослое клеток (Wound healing assay) [17]. Через 24 ч. после трансфекции ПС в 96-луночном планшете меняли на свежую. На следующий день клетки пересевали в другой 96-луночный планшет из расчета 20000 клеток на лунку (по четыре лунки на каждый сравниваемый вариант) и культивировали в термостате еще 24 ч. для достижения 85-90 % конfluэнтности. Затем по центру дна лунки наносили царапины, лунки дважды промывали 100 мкл PBS, после чего в лунки добавляли 100 мкл свежей ПС и фотографировали лунки с использованием системы IN Cell Analyzer 2000 (нулевая точка). Через 24 ч. инкубации повторно фотографировали лунки в тех же полях обзора (точка 24 ч.). Количественный анализ полученных изображений проводили с использованием программы ImageJ/Fiji (<https://imagej.nih.gov/ij>) со встроенным плагином Wound healing size tool, позволяющим автоматически рассчитывать площадь «царапины» [18]. Миграционная активность рассчитывалась по формуле $S_0 - S_{24} / S_0 \times 100\%$, где S_0 и S_{24} — площадь области, свободной от клеток в нулевой точке и через 24 ч. Статистическую значимость различий между группами определяли с помощью критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $P \leq 0.05$.

Выделение внеклеточных везикул (ВНВ) из кондиционной среды. После трансфекции, клетки инкубировались 24 ч. в ПС с 10 % FCS, затем ПС заменялась на бессывороточную, и инкубация клеток продолжалась еще 24 ч. Далее клетки осаждались при 500 g в течение 5 мин, отобранный супернатант (кондиционная среда) центрифугировался при 14000 g 10 мин для удаления фрагментов клеток и крупных белковых комплексов. ВНВ выделялись из очищенного таким образом супернатанта с помощью SubX™ технологии (SubX™-Exo plasma isolation kit, Capital Biosciences) [19] в соответствии с протоколом, описанным ранее [20].

Характеристика ВНВ. Размер и концентрацию ВНВ в образцах определяли методом анализа траекторий наночастиц (НТА), используя NanoSight® LM10 (Malvern Panalytical), оснащенный красным лазером с длиной волны 642 нм и CCD камерой. Суспензию ВНВ непосредственно перед введением в камеру разводили в 100 раз в 1xPBS, фильтрованном через фильтр с диаметром пор 220 нм до концентрации $5 \times 10^6 - 2 \times 10^8$ ВНВ/мл. Измерения для каждого образца проводили 3 раза. Полученные результаты анализировали с использованием программного обеспечения NTA 3.4 (Malvern Panalytical). Уровень экспрессии белковых маркеров ВНВ в образцах исследовались Вестерн-блот анализом, используя антитела к белкам-маркерам экзосом — Hsp70 и CD9. В качестве негативного контроля использовали антитела к специфическому белку эндоплазматического ретикулума - калнексину. Все антитела из Abcam (exosome panel ab275018).

Результаты

Целью данной работы было изучение влияния экзогенной экспрессии DUSP9 на проли-

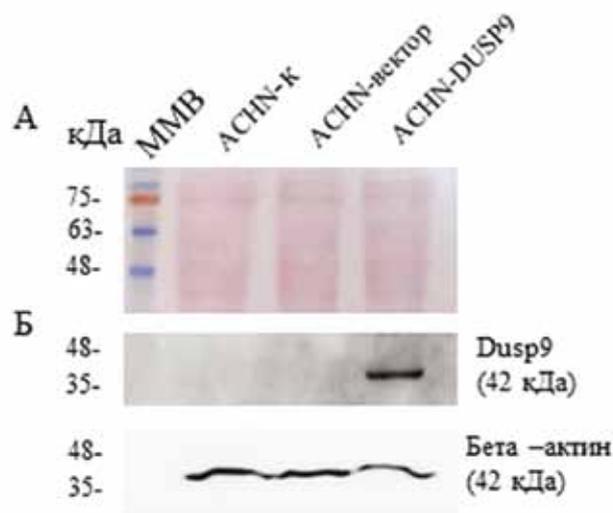


Рис. 1. Вестерн-блот белков, экстрагированных из ACHN клеток спустя 48 ч. после трансфекции. ACHN — контрольные клетки, трансфицированные смесью, не содержащей плазмидной ДНК; ACHN-вектор — клетки, трансфицированные пустым вектором и ACHN-DUSP9 — клетки, трансфицированные вектором с геном DUSP9. MMB — маркер молекулярного веса белков (ab116028, Abcam). Для контроля равномерности нанесения белков в лунки использовались (А) окраска мембраны Ронсеау S (81460, Fluka) и (С) иммуноблотинг с бета-актином

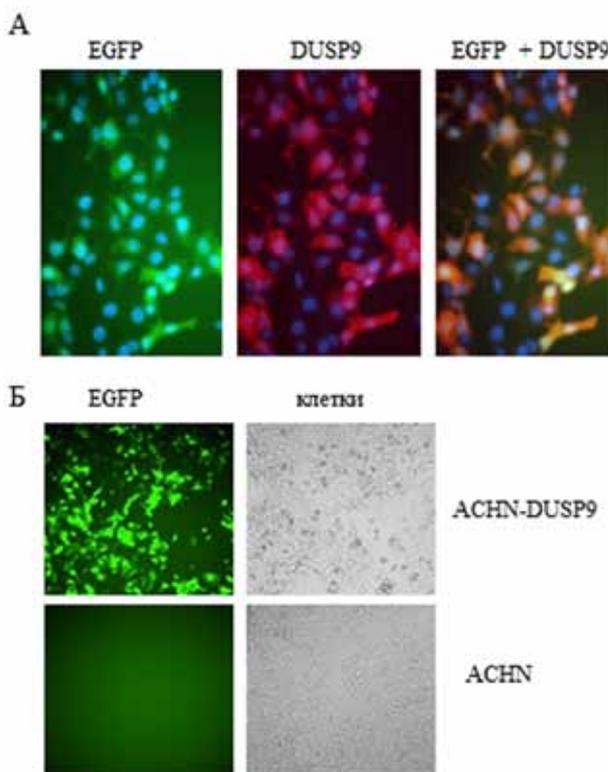


Рис. 2. Сравнение паттернов экспрессии EGFP и DUSP9 (А) и эффективность трансфекции (Б) 48 ч. после трансфекции клеток DUSP9-содержащим вектором. Изображения получены с помощью 20x/0,45NA (А) и 10x/0,45NA (Б) объектива IN Cell Analyzer 2000 (GE) системы. Ядра клеток окрашены DAPI (синий)

ферацию и миграционную способность клеток карциномы почки. В работе использовалась клеточная линия карциномы почки ACHN. В соответствии с результатами Вестерн-блота (рис. 1) и иммунофлуоресцентного анализов (на рис. 2Б

панель «ACHN»), ACHN клетки не содержат белка DUSP9.

Для трансфекции клеток мы использовали сконструированную нами ранее бицистронную плазмиду, содержащую последовательности кДНК гена *DUSP9* и гена-репортера *EGFP* (англ. enhanced green fluorescent protein, усиленный зелёный флуоресцентный белок). Поскольку гены *DUSP9* и *EGFP* имеют разные иницирующие трансляцию последовательности, то сначала мы проверили, совпадают ли картины экспрессии белков DUSP9 и EGFP в клетках, трансфицированных этим конструктом. Как видно на рис. 2А, паттерны экспрессии белков DUSP9 и EGFP совпадают. Это дало нам возможность оценивать долю клеток в популяции, экспрессирующих белок DUSP9, по доле клеток, экспрессирующих белок EGFP. Экспрессия DUSP9 достигала максимума к 48 ч. пост-трансфекционной инкубации (рис. 2Б). При этом доля трансфицированных клеток, экспрессирующих белок DUSP9, варьировала в экспериментах от 70 % до 90 %.

Для того, чтобы ответить на вопрос, влияет ли экзогенная экспрессия DUSP9 на пролиферативную активность клеток, мы сравнили относительное количество метаболизирующих клеток,

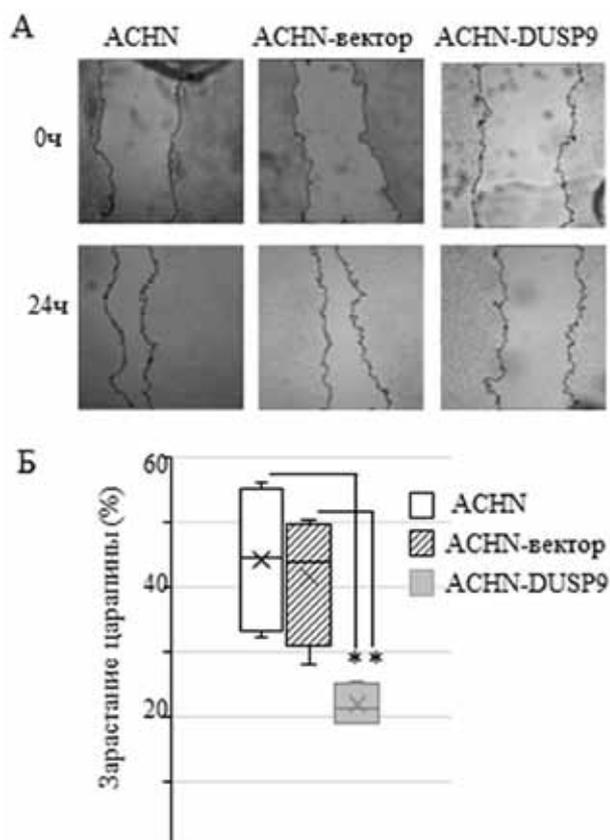


Рис. 3. Миграционная активность клеток. А. Изображения царапин в монослое клеток, полученные с помощью 10х/0,45NA объектива IN Cell Analyzer 2000. Б. Количественная оценка степени зарастания царапин за 24 ч. * — достоверность различий между группами $P < 0.05$

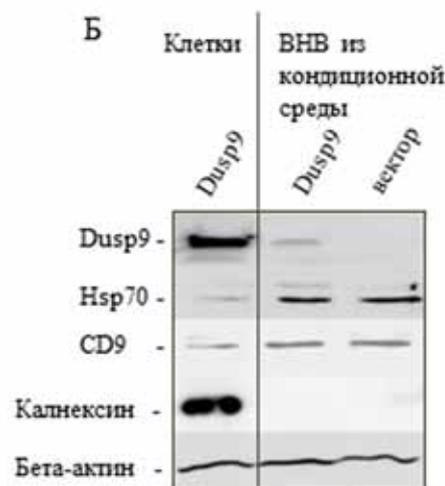
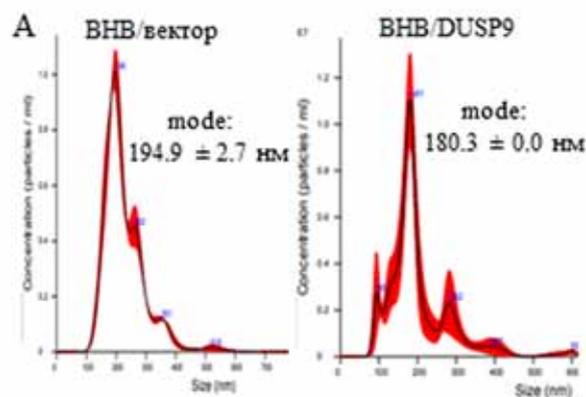


Рис. 4. Внеклеточные везикулы (BHB) из кондиционной среды трансфицированных клеток. А. Нано-трековый анализ BHB. Mode — модальный размер (\pm SD). Б. Вестерн-блот. Dusp9 — клетки, трансфицированные вектором с геном *DUSP9* и BHB из кондиционной среды после культивирования этих клеток. Вектор — BHB из кондиционной среды после культивирования клеток, трансфицированных пустым вектором. Hsp70, CD9 — маркеры экзосом. Калнексин — отрицательный маркер — белок неэкзосомального происхождения. Бета-актин — контроль количества

трансфицированных векторами с и без последовательности *DUSP9*, 24-48 ч. после трансфекции.

Таблица 1. Относительное количество метаболизирующих клеток 24-48 ч. после трансфекции

| Время после трансфекции (часы) | Количество метаболизирующих клеток (% $M \pm SD$), трансфицированных | |
|--------------------------------|---|-----------------|
| | DUSP9 плазмидой | пустым вектором |
| 0 | 100 | 100 |
| 24 | 84 \pm 8,5 | 89 \pm 3,6 |
| 48 | 70 \pm 7,2 | 77 \pm 5,6 |

К 48 ч. после трансфекции количество жизнеспособных клеток, трансфицированных плазмидой с *DUSP9* и пустым вектором, различались незначительно (табл. 1). Таким образом, в пределах рассматриваемого временного интервала экспрессия *DUSP9* не влияет на пролиферативную активность ACHN клеток.

Далее мы оценили влияние экспрессии DUSP9 на миграцию клеток. Для этого определяли степень зарастания «царапины» в монослое клеток через 24 ч. после нанесения повреждения. Этот временной интервал был выбран с целью минимизировать вклад процесса пролиферации клеток в уменьшение ширины царапины. На рис. 3А видно, что ширина царапины уменьшается спустя 24 ч. после нанесения повреждения и в контрольных клетках (ACHN) и в трансфицированных клетках (ACHN-вектор и ACHN-DUSP9). Однако миграционная способность клеток, трансфицированных конструктом с DUSP9, статистически значимо ниже, чем контрольных клеток и клеток, трансфицированных пустым вектором (рис. 3Б). Таким образом, мы показали, что экзогенная экспрессия DUSP9 замедляет миграцию ACHN клеток.

Большое количество исследований последнего десятилетия свидетельствует о том, что одну из ключевых ролей в процессе канцерогенеза играют экзосомы, продуцируемые первичной опухолью [21]. Экзосомы — это мембранные пузырьки диаметром 30 - 150 нм, формирующиеся клетками различных тканей и органов, и секретируемые в межклеточное пространство. Экзосомы являются транспортерами биологически активных молекул различных классов из клеток-доноров в клетки-реципиенты. Показано, что экзосомы, полученные из опухолевых клеток, участвуют в процессе метастазирования опухоли. С этой точки зрения нам представляется интересным понять, является ли DUSP9 участником экзосом-опосредованного сигнального пути. В этой работе мы попытались выяснить, может ли DUSP9 интернализироваться экзосомами. Чтобы ответить на этот вопрос, мы выделили внеклеточные везикулы (ВНВ) из кондиционной среды ACHN клеток, трансфицированных DUSP9 плазмидой, и исследовали наличие белка DUSP9 в выделенных ВНВ. Выделенные ВНВ характеризовали на основании данных нано-трекового анализа (НТА) и наличия в лизате ВНВ известных белковых маркеров экзосом.

ВНВ, выделенные из кондиционной среды клеток, трансфицированных плазмидой без вставки, имеют модалный размер $190 \pm 2,7$ нм, а трансфицированные DUSP9-плазмидой, -180 ± 0 нм (рис. 4А). Лизаты ВНВ содержат маркеры экзосом — CD9 и Hsp70, и не содержат калнексина, белка неэкзосомального происхождения (рис. 4Б). Как видно на Вестерн-блоте, экзосомы, выделенные из клеток, трансфицированных DUSP9 плазмидой, содержат белок DUSP9. Результат указывает на то, что белок DUSP9 может интернализироваться экзосомами.

Обсуждение

В работе мы показали, что экзогенная экспрессия DUSP9 замедляет миграцию ACHN клеток карциномы почки. Этот результат согласуется с результатами другого исследования, в котором также было показано снижение миграционной активности клеток СКК экзогенной экспрессией DUSP9 [7].

Мы показали, что экзогенная экспрессия DUSP9 не влияет на пролиферативную активность клеток КП в пределах 48 ч. после трансфекции. Такой же результат получили Luo и соавт. [7]. Однако авторы этой работы обнаружили замедление пролиферации клеток СКК спустя 4 сут после трансфекции. Также авторами было продемонстрировано уменьшение пролиферативной активности клеток СКК, трансфицированных DUSP9-содержащей экспрессионной плазмидой, в экспериментах на бестимусных мышах. Анализ пролиферативной активности клеток в нашем исследовании был ограничен 48 ч. интервалом, поскольку позже наблюдалась массивная гибель клеток, трансфицированных как пустым вектором, так и вектором со вставкой гена *DUSP9*. Это делало дальнейший анализ зависимости жизнеспособности клеток от экспрессии DUSP9 невозможным. По-видимому, гибель клеток связана с наличием в конструкте гена *EGFP*, экспрессия которого, как следует из литературных данных, может угнетать жизнеспособность клеток.

Ингибирующее действие DUSP9 на пролиферацию и миграцию клеток продемонстрировано также для некоторых других типов опухолей [8–10]. Таким образом, коллективные данные, полученные на момент написания этой статьи, указывают на то, что DUSP9 подавляет процессы пролиферации и миграции опухолевых клеток.

В этой работе мы показали, что DUSP9 белок обнаруживается в экзосомах бессывороточной кондиционной среды после культивирования ACHN клеток, трансфицированных DUSP9-экспрессирующим вектором. Это указывает на то, что активность DUSP9 в опухолеспецифичных процессах может быть опосредована экзосомальными сигнальными путями.

Заключение

Роль и механизмы регуляции DUSP9 при почечно-клеточном раке только начинают изучаться. Результаты, полученные нами и другими научными группами, указывают на участие DUSP9 в процессах метастазирования и пролиферации опухолевых клеток. Дальнейшие исследования необходимы для выявления последовательности

молекулярных событий, в которые вовлечена DUSP9 при этих процессах.

DUSP9 представляется привлекательной терапевтической мишенью. С этой точки зрения интересно, что в 2018 г. идентифицирована молекула некодирующей РНК, LincU, способная стабилизировать белок DUSP9 в активной форме [22]. Эта важная находка раскрывает возможности для разработки терапевтического подхода, направленного на поддержание DUSP9 в активном состоянии, что необходимо для лечения опухолей, в которых экспрессия DUSP9 подавлена, как в случае карциномы почки.

Два исследования последних лет связало DUSP9 с явлением устойчивости опухолей к химиотерапевтическим препаратам. В одном из них авторы показали, что DUSP9 индуцирует обогащение пула устойчивых к паклитакселю и карбоплатину стволовых клеток у проходящих химиотерапевтическое лечение пациенток с трижды негативным раком молочной железы [23]. В другом показано, что DUSP9 ингибирует активность серин-треониновой протеинкиназы mTOR (mammalian target of rapamycin) [7], т. е. имеет такую же направленность действия, что и темсиролимус и эверолимус, применяемых для лечения метастазирующих форм рака почки. В этой связи дальнейшее исследование регуляции активности DUSP9 в процессе приобретения опухолевыми клетками резистентного к терапевтическим препаратам фенотипа, представляет несомненный интерес. Мы надеемся, что будущие исследования молекулярных механизмов регуляции DUSP9 предоставят новые возможности для лечения пациентов с метастатической формой рака почки.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Исследование финансировалось в рамках НИОКТР № 121031100099-7.

Участие авторов

Якубович Е.И. — проведение исследования, подготовка иллюстративного материала, участие в редактировании текста;

Полищук А.Г. — проведение исследования, подготовка иллюстративного материала, написание текста рукописи;

Евтушенко В.И. — участие в проведении исследования и редактировании текста.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cheburkin YV, Knyazeva TG, Peter S, et al. Molecular portrait of human kidney carcinomas: The cDNA microarray profiling of kinases and phosphatases involved in the cell signaling control. *J Mol Biol.* 2002;36(3):376–380. doi:10.1023/A:1016059313254.

2. Muda M, Boschert U, Smith A, et al. Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4. *J Biol Chem.* 1997;272(8):5141–51. doi:10.1074/jbc.272.8.5141.
3. Khoubai FZ, Grosset CF. DUSP9, a dual-specificity phosphatase with a key role in cell biology and human diseases. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21):11538. doi:10.3390/ijms222111538.
4. Гранов А.М., Якубович Е.И., Евтушенко В.И. Множественный параллельный анализ экспрессии генов как инструмент молекулярной диагностики рака почки и предстательной железы. *Медицинский Академический Журнал.* 2006;6(1):131–138 [Granov AM, Jakubovich EI, Yevtushenko VI. Multiple parallel gene expression analysis as a tool for molecular diagnosis of renal and prostate cancer. *Medical Academic Journal.* 2006;6(1):131–138 (In Russ.)].
5. Zhou L, Chen J, Li Z, et al. Integrated profiling of microRNAs and mRNAs: microRNAs located on Xq27.3 associate with clear cell renal cell carcinoma. Creighton C, editor. *PLoS ONE.* 2010;5(12):e15224. doi:10.1371/journal.pone.0015224.
6. Wu S, Wang Y, Sun L, et al. Decreased expression of dual-specificity phosphatase 9 is associated with poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2011;11(1). doi:10.1186/1471-2407-11-413.
7. Luo J, Luo X, Liu X, et al. DUSP9 suppresses proliferation and migration of clear cell renal cell carcinoma via the mTOR pathway. *OncoTargets Ther.* 2020;13:1321–1330. doi:10.2147/OTT.S239407.
8. Wu F, Lv T, Chen G, et al. Epigenetic silencing of DUSP9 induces the proliferation of human gastric cancer by activating JNK signaling. *Oncol Rep.* 2015;34:121–128. doi:10.3892/or.2015.3998.
9. Qiu Z., Liang N., Huang Q. et al. Downregulation of DUSP9 promotes tumor progression and contributes to poor prognosis in human colorectal cancer. *Front. Oncol.* 2020;10:54701. doi:10.3389/fonc.2020.547011.
10. Liu Y, Lagowski J, Sundholm A, et al. Microtubule disruption and tumor suppression by mitogen-activated protein kinase phosphatase 4. *Cancer Res.* 2007;67(22):10711–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1968.
11. Liu J, Ni W, Xiao M, et al. Decreased expression and prognostic role of mitogen-activated protein kinase phosphatase 4 in hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Surg.* 2013;17(4):756–65. doi:10.1007/s11605-013-2138-0.
12. Chen K, Gorgen A, Ding A, et al. Dual-specificity phosphatase 9 regulates cellular proliferation and predicts recurrence after surgery in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Commun.* 2021;5(7):1310–28. doi:10.1002/hep4.1701.
13. Гранов А.М., Якубович Е.И., Лавникович Д.М., Евтушенко В.И. Гендерные различия в метилировании 5'-фланкирующей области гена DUSP9 у больных со светлоклеточной карциномой почки. *Медицинский академический журнал.* 2008;8(3):71–76 [Granov AM, Jakubovich EI, Lavnikovich DM, et al. Gender differences in methylation of 5' region of DUSP9 in clear cell renal cell carcinoma. *Medical Academic Journal.* 2008;8(3):71–76 (In Russ.)].
14. Якубович Е.И., Лавникович Д.М., Евтушенко В.И. Потенциальная роль эпигенетических факторов в инактивации гена DUSP9 при светлоклеточной карциноме почки. *Современные исследования социальных проблем (электронный научный журнал).* 2013;9:29 [Jakubovich EI, Lavnikovich DM, Yevtushenko VI. Potential role of epigenetic factors in DUSP9 gene inactivation

in clear cell renal cell carcinoma. *Modern Studies of Social Issues* (scientific e-journal). 2013;9:29 (In Russ.]. doi:10.12731/2218-7405-2013-9-28.

15. Гранов А.М., Вершинина С.Ф., Якубович Е.И. и др. Антибластомный эффект экспрессионной плазмиды с геном DUSP9 на модели солидной карциномы эрлиха у мышей SHR. *Медицинский академический журнал*. 2016;16(3):75–81 [Granov AM, Verшинina SF, Jakubovich EI, et al. The antitumor effect of expression plasmid bearing DUSP9 gene in SHR mice having solid ehrlich carcinoma. *Medical Academic Journal*. 2016;16(3):75–81 (In Russ.)].
16. Sylvester PW. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods Mol Biol*. 2011;716:157–168. doi:10.1007/978-1-61779-012-6_9.
17. Cory G. Scratch-wound assay. *Methods Mol Biol*. 2011;769:25–30. doi:10.1007/978-1-61779-207-6_2.
18. Suarez-Arnedo A, Torres Figueroa F, Clavijo C, et al. An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *Chirico G, editor. PLoS One*. 2020;15(7): e0232565. doi:10.1371/journal.pone.0232565.
19. Malykh AG, Malek A, Lokshin A, et al. Abstract 1618: Simultaneous isolation of exosomes and cfDNA from liquid biopsies using universal kit based on SubX-Matrix™ technology. *Cancer Res*. 2018;78(13_Suppl):1618–1618. doi:10.1158/1538-7445.am2018-1618.
20. Shtam T, Evtushenko V, Samsonov R, et al. Evaluation of immune and chemical precipitation methods for plasma exosome isolation. *Patel GK, ed. PLoS One*. 2020;15(11): e0242732. doi:10.1371/journal.pone.0242732.
21. Tenchov R, Sasso JM, Wang X, et al. Exosomes–Nature’s lipid nanoparticles, a rising star in drug delivery and diagnostics. *ACS Nano*. 2022;10. doi:10.1021/acsnano.2c08774.
22. Jiapaer Z, Li G, Ye D, et al. LincU preserves naive pluripotency by restricting ERK activity in embryonic stem cells. *Stem Cell Rep*. 2018;11:395–409. doi:10.1016/j.stemcr.2018.06.010.
23. Lu H, Tran L, Park Y, et al. Reciprocal regulation of DUSP9 and DUSP16 expression by HIF1 controls ERK and P38 MAP kinase activity and mediates chemotherapy-induced breast cancer stem cell enrichment. *Cancer Res*. 2018;78:4191–4202. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-0270.

Поступила в редакцию 05.12.2022
 Прошла рецензирование 16.12.2022
 Принята в печать 16.02.2023

*E.I. Yakubovich, A.G. Polischouk,
 V.I. Evtushenko*

Exogenous expression of protein phosphatase DUSP9 reduces the rate of migration of kidney carcinoma cells

A.M. Granov Russian research Center for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, the Russian Federation

Introduction. DUSP9/MKP-4 is a dual-specificity protein phosphatase that negatively regulate mitogen-activated protein kinases (ERK, p38 and JNK). Mounting evidence of the last decade studies suggest that DUSP9 may play a significant role in a targeted therapy for renal cell cancer. Cheburkin et al. in 2002 [1] and, in subsequent years, many other research groups have reported a significant decrease in the level of DUSP9 mRNA in clinical kidney carcinoma (KC) samples compared to normal tissue. We have shown that inhibition of DUSP9 mRNA expression occurs already in the early stages of KC and that the *DUSP9* expression can be regulated at the epigenetic level in a gender-dependent manner.

Aim. To study the effect of exogenous expression of DUSP9 on proliferation and migration of human KC cells.

Materials and methods. The study used DUSP9-negative human KC cell line ACHN. We designed a DUSP9 expression vector for cell transfection. Transfection efficiency by DUSP9 expressing plasmid was evaluated by immunofluorescence and Western blot, the number of viable cells by MTT-test and the rate of cell migration by scratch-wound assay. Extracellular vesicles from serum free cell culture conditioned medium (CM) were isolated using SubXTM technology and characterized by nanoparticle tracking analysis (NTA) and Western blot.

Results. Transfection efficiency was 70 %-90 %. The number of viable cells expressing DUSP9 and cells transfected with the vector with no insert differed slightly 48 hours after transfection. DUSP9 expression significantly reduced the rate of cell migration compared to the control. DUSP9 was detected in the exosomal fraction of CM from DUSP9-expressing cells.

Conclusion. The study has shown that exogenous expression of DUSP9 slows down KC cell migration. The result suggests that DUSP9 may possibly regulate metastasis in renal carcinogenesis.

Keywords: DUSP9/MKP4 protein phosphatase; kidney carcinoma; cell proliferation and migration; metastasis

For citation: Yakubovich EI, Polischouk AG, Evtushenko VI. Exogenous expression of protein phosphatase DUSP9 reduces the rate of migration of kidney carcinoma cells. *Voprosy Onkologii*. 2023;69(3):00–00. doi:

Сведения об авторах

Якубович Елена Игоревна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории генной инженерии ФГБУ «РНЦРХТ» Минздрава России, 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 70; ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0107-5413>, jakubovichelena@mail.ru.

Полищук Анна Генриховна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории генной инженерии ФГБУ «РНЦРХТ» Минздрава России, 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 70; ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0787-6588>, polischouka@mail.ru.

Евтушенко Владимир Иванович, д-р. биол. наук, руководитель лаборатории генной инженерии ФГБУ «РНЦРХТ» Минздрава России, 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 70; ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1577-4178>, mol-biol@yandex.ru.

Yakubovich Elena Igorevna, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Genetic Engineering, A.M. Granov Russian research Center for Radiology and Surgical Technologies, 70 Leningradskaya St., Pesochnyy, Saint-Petersburg 197758, Russia, jakubovichelena@mail.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0107-5413>.

Polischouk Anna Genrixovna, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Genetic Engineering, A.M. Granov Russian research Center for Radiology and Surgical Technologies, 70 Leningradskaya St., Pesochnyy, Saint-Petersburg 197758, Russia, polischouka@mail.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0787-6588>.

Evtushenko Vladimir Ivanovich, Dr.habil., Head of the Laboratory of Genetic Engineering, A.M. Granov Russian research Center for Radiology and Surgical Technologies, 70 Leningradskaya St., Pesochnyy, Saint-Petersburg 197758, Russia, mol-biol@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1577-4178>.