



РЕКОМБИНАНТНЫЙ SLURP-1 ИНГИБИРУЕТ РОСТ И МИГРАЦИЮ ГЛИОМЫ U251 MG В РЕЗУЛЬТАТЕ АРЕСТА КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА И МОДУЛЯЦИИ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ МАРК И АКТ¹

© 2023 г. М. А. Шулепко*, **, М. Л. Бычков**,
М. П. Кирпичников**, ***, Е. Н. Люкманова*, **, ***, #

*Шеньчжэньский МГУ-ППИ Университет, Китай, 518172, Провинция Гуандун,
Шэньчжэнь, р-он Лунган, Даюньсиньчэн, ул. Гоцзидасюэюань, 1

**ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

***Междисциплинарная научно-образовательная школа “Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология”, биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
Россия, 119234 Москва, ул. Ленинские горы, 1/12

Поступила в редакцию 30.11.2022 г.

После доработки 10.12.2022 г.

Принята к публикации 12.12.2022 г.

Рекомбинантный аналог белка SLURP-1 человека (rSLURP-1) эффективно ингибирует рост карцином, взаимодействуя с никотиновым ацетилхолиновым рецептором $\alpha 7$ -типа. Недавно мы показали, что rSLURP-1 также ингибирует рост глиом *in vitro*, однако механизм действия rSLURP-1 в глиомах не был изучен. В представленной работе мы выяснили, что rSLURP-1 избирательно ингибирует рост клеток глиомы U251 MG, но не нормальных астроцитов, а также тормозит миграцию клеток глиомы. Кроме того, rSLURP-1 тормозит прохождение клеточного цикла в фазе G2/M, но не вызывает апоптоз. Инкубация клеток U251 MG с rSLURP-1 приводит к ингибированию в них фосфорилирования киназ ERK, p38 MAPK и АКТ, активация которых способствует прогрессии глиом. При этом rSLURP-1 не влияет на активность киназы JNK. Таким образом, rSLURP-1 представляет собой эндогенный белок, перспективный для разработки на его основе препаратов для лечения не только карцином, но и глиом.

Ключевые слова: SLURP-1, Луб/iPAR, Lypx1, никотиновый ацетилхолиновый рецептор, рак, глиома

DOI: 10.31857/S0132342323040401, **EDN:** ODXOTP

ВВЕДЕНИЕ

Глиомы составляют более 80% опухолей головного мозга и состоят из астроцитов, олигодендроцитов, а также других типов клеток [1, 2]. Средняя выживаемость пациентов с глиомами составляет лишь 12–15 месяцев [2, 3]. Хирургическое удаление опухолей, а также химиотерапия показывают низкую эффективность [4], что опре-

деляет актуальность поиска новых молекулярных мишеней и действующих на них соединений для терапии глиом.

Одна из перспективных молекулярных мишеней для разработки новых противоопухолевых препаратов – никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR) [5, 6]. Рецепторы nAChR представляют собой лигандзависимые ионные каналы, которые активируются ацетилхолином и участвуют в регуляции многих жизненно важных процессов в центральной и периферической нервной системе [7], эпителиальных клетках и иммунной системе [8]. Подтип nAChR, состоящий из пяти одинаковых субъединиц $\alpha 7$ -типа ($\alpha 7$ -nAChR), вовлечен в процессы никотинзависимой онкогенной трансформации и прогрессии карцином [9]. Нарушение регуляции $\alpha 7$ -nAChR может приводить к активации митогенных сигнальных путей ERK/MEK и PI3K/АКТ/mTOR, ингибированию старения клеток и апоптоза, в

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Вадима Тихоновича Иванова.

Сокращения: АКТ – протеинкиназа В; ERK – внеклеточная сигнально-регулируемая киназа; JNK – киназа Jun; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; mTOR – мишень рапамицина млекопитающих; nAChR – никотиновый ацетилхолиновый рецептор; NNN – N-нитрозонорникотин; NNK – 4-(метилнитрозамино)-1-(3-пиридил)-1-бутанон; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; rSLURP-1 – рекомбинантный аналог белка SLURP-1 человека.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-80-11, эл. почта: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru).

результате чего происходит стимуляция образования опухолей [10–12]. В соответствии с этим экспрессия гена *CHRNA7*, кодирующего $\alpha 7$ -субъединицу nAChR, повышена в некоторых карциномах пациентов [13] и клеточных линиях глиом [14].

Некоторые эндогенные белки семейства *Lu6/uPAR* [15–17], такие как C4.4A, uPAR, *Lu6D*, *Lu6E*, *Lu6H*, *Lu6K*, *Lynx1*, *SLURP-1* и *PSCA*, в настоящее время рассматриваются как биомаркеры развития различных опухолей [15, 18–27]. Один из таких белков человека – секретлируемый регулятор гомеостаза кератиноцитов *SLURP-1* [28]. Экспрессия гена *SLURP1* снижается в клетках карциномы толстой кишки при их обработке никотином [29], в карциномах легкого курящих мужчин по сравнению со здоровыми тканями легкого [25], в первичных и метастазирующих меланомах [24], а также в кератиноцитах человека в результате онкогенной трансформации нитрозаминнами NNK и NNN, содержащимися в табаке [30]. В то же время повышенная концентрация эндогенного *SLURP-1* в крови пациентов с раком поджелудочной железы коррелирует с лучшим прогнозом выживаемости пациентов после хирургического удаления первичной опухоли [26].

Рекомбинантный аналог белка *SLURP-1* человека (rSLURP-1) ингибирует вызванные ацетилхолином токи через $\alpha 7$ -nAChR [31] и подавляет рост различных раковых клеток эпителиального происхождения [32–35]. Более того, rSLURP-1 снижает пролиферацию клеток аденокарциномы легкого A549 при их обработке никотином посредством взаимодействия с $\alpha 7$ -nAChR [34]. Сигнальный путь PI3K/АКТ/mTOR вовлечен в антипролиферативную и антимиграционную активность rSLURP-1 в клетках A549 [34, 35].

Ранее мы показали, что помимо карцином rSLURP-1 ингибирует рост клеток глиом U251 MG и A172 с наномолярной эффективностью, при этом в клетках глиомы U251 MG активность rSLURP-1 была обусловлена взаимодействием с $\alpha 7$ -nAChR [14]. В данной работе мы изучили селективность действия препарата rSLURP-1 по отношению к глиомам U251 MG и нормальным астроцитам первичной линии, выявили наличие у rSLURP-1 антимиграционной активности, а также исследовали молекулярные и клеточные механизмы, обеспечивающие эффекты rSLURP-1 в клетках глиом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

rSLURP-1 подавляет рост глиомы U251 MG, но не действует на клетки нормальных астроцитов. Рекомбинантный *SLURP-1* эффективно ингибирует рост клеток глиом U251 MG и A172, взаимодействуя с $\alpha 7$ -nAChR [14]. Сравнительный анализ выявил повышенную экспрессию гена *CHRNA7*,

кодирующего $\alpha 7$ -nAChR, в клетках U251 MG по сравнению с нормальными астроцитами [14]. Поскольку $\alpha 7$ -nAChR – основная мишень действия rSLURP-1 [31], мы предположили, что повышенная экспрессия $\alpha 7$ -nAChR в глиомах может определять специфичность действия rSLURP-1 на опухолевые клетки. Поэтому мы сравнили действие rSLURP-1 на клетки глиом U251 MG и на нормальные астроциты, выделенные из гиппокампа новорожденных крыс. Анализ жизнеспособности клеток при помощи МТТ-теста показал, что в отличие от клеток U251 MG, инкубация астроцитов с 1 мкМ rSLURP-1 в течение 72 ч не приводила к достоверному подавлению их роста (рис. 1). Таким образом, rSLURP-1 селективно действует на различные клетки глиом и не оказывает влияния на рост нормальных астроцитов.

Полученный результат согласуется с исследованиями, показавшими, что нормальные фибробласты легкого, демонстрирующие пониженную экспрессию $\alpha 7$ -nAChR по сравнению с аденокарциномой легкого A549 [34], менее чувствительны к rSLURP-1, чем клетки A549 [32, 33]. Таким образом, rSLURP-1 можно рассматривать как универсальный регулятор роста именно раковых клеток различного происхождения, а повышенный уровень экспрессии $\alpha 7$ -nAChR может служить показателем большей чувствительности опухолевых клеток к rSLURP-1.

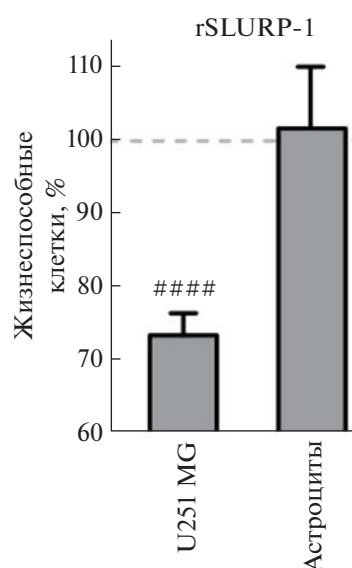


Рис. 1. Антипролиферативный эффект рекомбинантного белка rSLURP-1 на клетках глиомы U251 MG и нормальных астроцитах гиппокампа крысы. Клетки инкубировали с 1 мкМ rSLURP-1 в течение 72 ч. Данные приведены в процентах от контроля (необработанные клетки, пунктирная линия) \pm стандартная ошибка среднего ($n = 3$ для астроцитов, $n = 4$ для клеток U251 MG). #### $p < 0.0001$ (достоверное отличие от контроля согласно one-sample *t*-тесту).

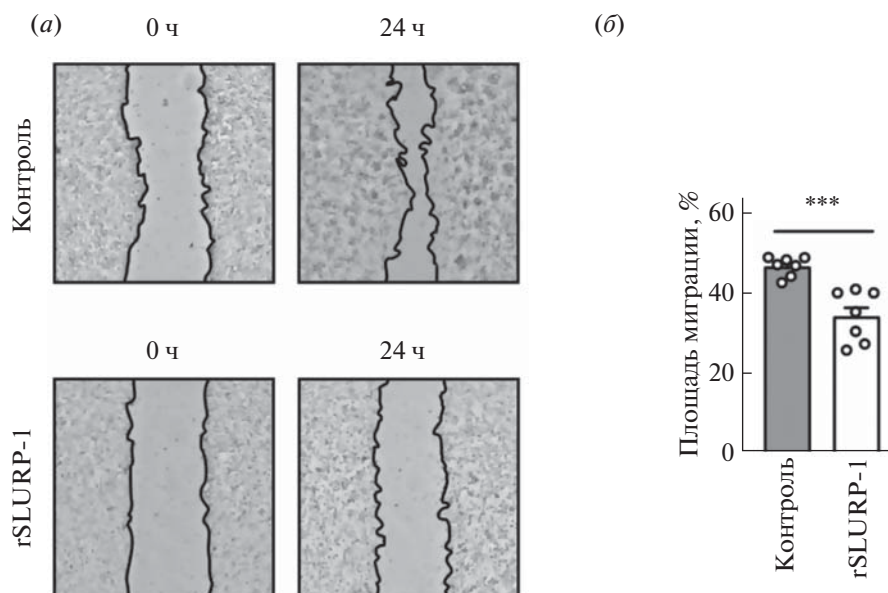


Рис. 2. Влияние рекомбинантного белка rSLURP-1 на миграцию клеток глиомы U251 MG. (а) – Репрезентативные изображения теста “заживление раны” для клеток U251 MG, инкубированных с 1 мкМ rSLURP-1 в течение 72 ч; (б) – площадь, занимаемая мигрирующими клетками U251 MG. Данные представлены в процентах от исходной поверхности, занятой мигрирующими клетками, ± стандартная ошибка среднего ($n = 7$). *** $p < 0.001$ (достоверное отличие между группами по двустороннему t -тесту).

В то же время, возможно, избирательность rSLURP-1 связана не только с уровнем экспрессии проонкогенного рецептора $\alpha 7$ -nAChR, но и с вероятным образованием комплексов $\alpha 7$ -nAChR с другими проонкогенными рецепторами в раковых клетках, например, с рецепторами различных факторов роста [36]. Возможность действия лигандов $\alpha 7$ -nAChR через связанные с ним рецепторы обсуждалась давно, в частности мы показали, что мишень действия rSLURP-1 в клетках аденокарциномы легкого A549 – гетерокомплекс $\alpha 7$ -nAChR с рецептором эпидермального фактора роста EGFR и рецептором тромбоцитарного фактора роста PDGFR [35].

rSLURP-1 вызывает снижение миграции клеток глиомы U251 MG. SLURP-1 ингибирует миграцию раковых клеток поджелудочной железы [26], аденокарциномы легкого A549 [35] и клеток метастатической меланомы [37]. В настоящей работе с помощью теста на миграцию (тест на зарастание раны, scratch assay) мы исследовали влияние rSLURP-1 на миграцию клеток глиомы U251 MG (рис. 2). Инкубация клеток U251 MG с 1 мкМ rSLURP-1 в течение 24 ч приводила к значительному снижению площади, занятой клетками, – на ~34% по сравнению с необработанными клетками. Таким образом, rSLURP-1 ингибирует миграцию не только раковых клеток эпителиального происхождения, но также и глиом. Ранее было показано, что активация $\alpha 7$ -nAChR никотином не приводит к усилению миграции клеток U251 MG, но увеличивает активность металлопротеазы MMP9 [38]. Таким об-

разом, возможно, ингибирование $\alpha 7$ -nAChR с помощью rSLURP-1 приводит к подавлению миграции раковых клеток также с участием MMP-9. Поскольку миграция – это процесс, тесно связанный с инвазивностью и метастазированием опухолей, ингибирование миграции при помощи rSLURP-1 дополнительно демонстрирует перспективность разработки на основе этого эндогенного белка препаратов для терапии глиом.

rSLURP-1 тормозит прохождение клеточного цикла в клетках глиомы U251 MG. Мы проанализировали влияние rSLURP-1 на прогрессию клеточного цикла в клетках глиомы U251 MG. Анализ с помощью проточной цитометрии показал, что в клетках U251 MG rSLURP-1 уменьшает количество клеток в фазе G1 (с ~67 до ~57%) и увеличивает количество клеток в фазе G2/M (с ~17 до ~27%) (рис. 3а, 3б), что указывает на торможение прохождения клеточного цикла в фазе G2/M. Мы не обнаружили характерного для апоптоза увеличения популяции клеток в фазе sub-G1 [39]. Анализ морфологии ядер также не выявил признаков апоптоза в клетках глиомы U251 MG (рис. 3в). Таким образом, rSLURP-1 в клетках глиомы U251 MG тормозит прохождение клеточного цикла, но не вызывает апоптоз. Это соответствует ранее полученным данным о том, что rSLURP-1 приводит к аресту клеточного цикла в клетках аденокарциномы легкого A549, не индуцируя при этом апоптоз [35]. Более того, полученные данные согласуются с влиянием на клеточный цикл в клетках A549 другого белка семейства Lu6/uPAR, также

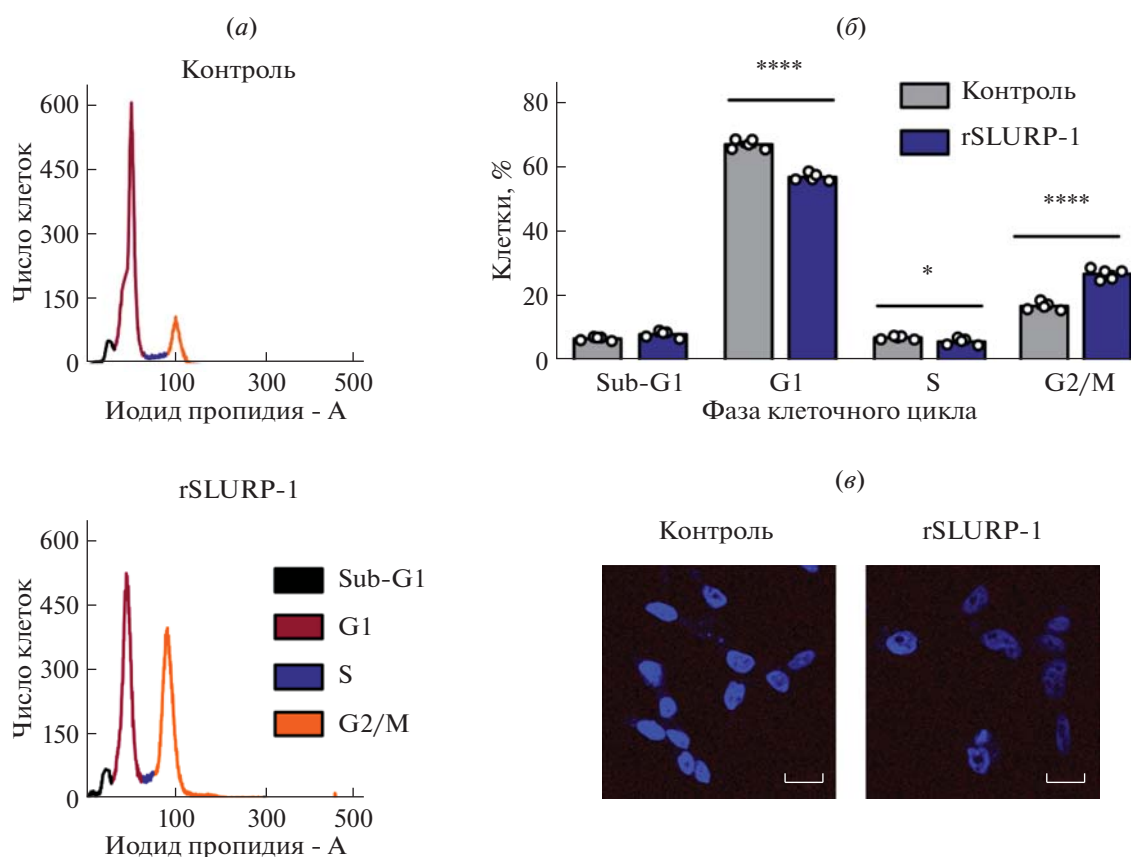


Рис. 3. Влияние рекомбинантного белка rSLURP-1 на клеточный цикл и морфологию ядер клеток глиомы U251 MG. (a) – Репрезентативное распределение популяции ядер клеток U251 MG, обработанных и не обработанных 1 мкМ rSLURP-1 в течение 72 ч; (б) – содержание клеток в различных фазах клеточного цикла. Данные представлены в процентах клеток в каждой фазе клеточного цикла \pm стандартная ошибка среднего ($n = 5$). * $p < 0.05$ и **** $p < 0.0001$ (достоверное отличие между группами по двустороннему t -тесту); (в) – анализ морфологии ядер клеток после инкубации с rSLURP-1 при их окрашивании Хехстом 33342 и йодидом пропидия (в канале йодида пропидия сигнала не было), масштабный отрезок – 10 мкм.

модулирующего работу $\alpha 7$ -nAChR в эпителиальных клетках, – Lynx1 [40]. Возможно, это указывает на существование общего молекулярного механизма торможения роста раковых клеток в результате ингибирования $\alpha 7$ -nAChR.

rSLURP-1 подавляет активацию киназ ERK, p38 MAPK и AKT, но не JNK, в клетках U251 MG. Мы проанализировали влияние rSLURP-1 на активность основных внутриклеточных сигнальных путей в клетках U251 MG, опосредующих прогрессию глиом и связанных с активностью $\alpha 7$ -nAChR [41–43]. Результаты анализа с помощью магнитных частиц Bio-Plex показали, что 72-часовая инкубация клеток глиомы с 1 мкМ rSLURP-1 приводила к достоверному снижению активности киназ ERK, p38 MAPK и AKT, но не JNK (рис. 4).

Ранее мы показали, что rSLURP-1 в клетках аденокарциномы легкого A549 модулирует передачу внутриклеточных сигналов через инозитол-1,4,5-трисфосфат (IP3) и сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR. Однако rSLURP-1 не влияет

на активность основного митогенного пути MEK/ERK и путей, ассоциированных с p38 MAPK и AKT [35]. При этом Lynx1 модулирует в клетках A549 внутриклеточные каскады, связанные с сигнальными путями PKC/IP3, MEK/ERK, p38 MAPK и JNK [40]. Сравнение полученных в настоящей работе данных с результатами предыдущих исследований позволяют сделать вывод, что арест клеточного цикла в фазе G2/M, наблюдаемый при инкубации раковых клеток с rSLURP-1 или Lynx1, может достигаться за счет разных молекулярных механизмов. Подавление активности киназ ERK, p38 MAPK и AKT опосредует арест клеточного цикла в клетках глиом, а в карциномах этот же процесс происходит за счет ингибирования других киназ.

Ранее нами на основе фрагмента петли I молекулы SLURP-1 был получен синтетический пептид, который ингибирует ток через $\alpha 7$ -nAChR и тормозит рост и миграцию клеток аденокарциномы легкого A549 [35]. Полученные в настоящей

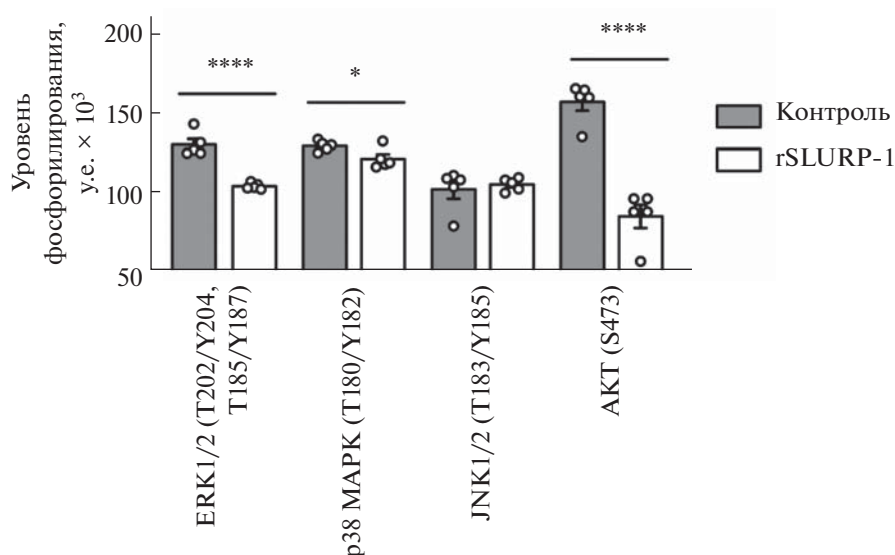


Рис. 4. Влияние рекомбинантного белка rSLURP-1 на активность основных митогенных сигнальных путей в клетках глиомы U251 MG. Клетки инкубировали с 1 мкМ rSLURP-1 в течение 72 ч и анализировали фосфорилирование киназ ERK, p38 MAPK, JNK и AKT посредством технологии MagPix (набор BioPlex Pro; Bio-Rad, США). Данные представлены в виде уровня фосфорилирования \pm стандартная ошибка среднего ($n = 5$). * $p < 0.05$ и **** $p < 0.0001$ (достоверное отличие между группами по двустороннему t -тесту).

работе данные указывают на необходимость дальнейших исследований противоопухолевого действия rSLURP-1 и его пептидного миметика в клетках глиом. Поскольку активация $\alpha 7$ -nAChR может способствовать прогрессии глиом [44, 45], применение ингибиторов данного рецептора может стать новой стратегией терапии этих злокачественных образований.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток. Клетки глиомы U251 MG (НИИ цитологии РАН, Россия) культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Nucleon, Великобритания).

Животных содержали в стандартных условиях Питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Уникальная научная установка Био-модель ИБХ РАН; Биоресурсная коллекция “Коллекция лабораторных грызунов SPF-статуса для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований”, соглашение № 075-15-2021-1067), имеющего международную аккредитацию AAALACi. Астроциты новорожденных крыс получали по описанной ранее методике [46] и культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Nucleon, Великобритания). Астроциты выращивали на пластике, обработанном поли-L-лизинном (ПанЭко, Россия). Клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂, пересевали минимум 2 раза в неделю.

Получение rSLURP-1. Рекомбинантный препарат SLURP-1 получали, как описано ранее [47], чистоту и правильную пространственную структуру препарата подтверждали с помощью масс-спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и ¹H-ЯМР-спектроскопии.

Влияние rSLURP-1 на жизнеспособность глиомных клеток и астроцитов. Клетки высевали в 96-луночные культуральные планшеты (5 × 10³ клеток на лунку в 100 мкл среды), 1 мкМ rSLURP-1 (из 250 мкМ стока в 100%-ном ДМСО (Applichem, Германия)) растворяли в культуральной среде и добавляли к клеткам. После этого клетки инкубировали в течение 72 ч с заменой среды на свежую каждые 24 ч. Максимальная концентрация ДМСО не превышала 0.5%, добавленный ДМСО не влиял на рост клеток, что было подтверждено в отдельном эксперименте. В каждом эксперименте в контрольные лунки добавляли ДМСО в концентрации, аналогичной таковой в пробах с rSLURP-1. Жизнеспособность клеток оценивали при помощи МТТ-теста. К клеткам добавляли МТТ (ПанЭко, Россия) в конечной концентрации 0.1 мг/мл, инкубировали в течение 4 ч. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в изопропанолем с 75 мМ HCl, после чего определяли поглощение в лунках планшета при 540 нм с выравниванием на фон при 655 нм на планшетном ридере Bio-Rad 680 (Bio-Rad, США). Оптическую плотность лунок планшета нормировали на оптическую плотность лунок с необработанными клетками, полученные результаты анали-

зировали с помощью программы Graphpad Prism 8.0 (GraphPad Software, США).

Влияние rSLURP-1 на миграцию клеток U251 MG. Анализ влияния rSLURP-1 на миграцию клеток U251 MG в модели “заживление раны” *in vitro* (scratch assay) проводили согласно методике Burchkov et al. [35]. Клетки U251 MG высевали в 96-луночные планшеты (5×10^4 клеток/лунку) и выращивали в течение 24 ч. Затем среду из лунок заменяли на среду без сыворотки, чтобы минимизировать возможную пролиферацию клеток. Через 8 ч, стерильным наконечником пипетки объемом 10 мкл, на дне лунки процарапывали вертикальную полосу (насадка GenFollower, E-FTB10S, Китай), после чего клетки промывали PBS и обрабатывали rSLURP-1, разведенным в среде из 250 мкМ стока в 100%-ном ДМСО. В контрольные лунки добавляли ДМСО без rSLURP-1. Снимки лунок с процарапанными полосами анализировали через 0 и 24 ч при 20-кратном увеличении, используя систему анализа клеток Clone-Select Imager (Molecular Devices, США). Центр лунки планшета отмечали как центральную точку отсчета, чтобы обеспечить фотографирование лунки без сдвига. Были сделаны цифровые изображения, площадь царапин оценивали с помощью программ ImageJ (НИН, США) и MS Excel, вычисляя процент поверхности царапин, занятой мигрирующими клетками. В каждом эксперименте повторяющиеся измерения усредняли.

Анализ клеточного цикла. Для анализа клеточного цикла клетки U251 MG высевали в 6-луночные культуральные планшеты (25×10^4 клеток/лунку) и инкубировали с 1 мкМ rSLURP-1 в течение 72 ч с заменой среды на свежую каждые 24 ч. Затем клетки фиксировали в 70%-ном этаноле в течение 12 ч (-20°C), дважды промывали раствором Эрла и инкубировали в буфере для облегчения прохождения иодида пропидия в клетки, их мембрану пермеабелизовали буфером для пермеабелизации (200 мМ Na_2HPO_4 с 0.004% Triton X-100, pH 7.8) в течение 5 мин. Затем клетки промывали и ресуспендировали в растворе Эрла с 50 мг/мл иодида пропидия и 0.2 мг/мл РНКазы А, после чего анализировали на цитофлуориметре Attune NxT (Life Technologies, США). Процентное содержание клеток в фазах клеточного цикла определяли с использованием программы Attune NxT Software (Life Technologies, США).

Анализ фосфорилирования внутриклеточных киназ. Фосфорилирование клеточных сигнальных белков анализировали с помощью магнитных частиц Bio-Plex с набором реагентов для клеточной сигнализации Bio-Plex Pro (Bio-Rad, США). Клетки инкубировали в течение 48 ч с добавлением 1 мкМ rSLURP-1 из 250 мкМ стока в 100% исходного ДМСО, после чего лизировали с использованием буфера, входящего в состав на-

бора. Анализ проводили на аппарате Bio-Plex 200 (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкциями производителя. Использовали наборы частиц и детектирующих антител для определения уровней фосфорилирования: ERK (171V50006M), p38 MAPK (171V50014M), JNK (171V50011M) и АКТ (171V50001M).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые показано, что рекомбинантный белок rSLURP-1 тормозит рост клеток глиомы, ингибирует их миграцию и вызывает арест клеточного цикла в клетках глиомы U251 MG в фазе G2/М. Эффекты, вызываемые rSLURP-1 в клетках глиомы, опосредованы подавлением активности киназ ERK, p38 MAPK и АКТ. Таким образом, рекомбинантный белок rSLURP-1 может являться прообразом новых противоглиомных препаратов – модуляторов никотиновых рецепторов ацетилхолина.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-74-20161).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Получение астроцитов новорожденных крыс проводили в соответствии с протоколом IACUC ИБХ РАН № 312/2020 от 21 декабря 2021 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

М.А. Шулепко и М.Л. Бычков внесли равноценный вклад в написание статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cahill D., Turcan S. // *Semin. Neurol.* 2018. V. 38. P. 5–10. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1620238>
2. Hu Y., Jiang Y., Behnan J., Ribeiro M.M., Kalantzi C., Zhang M.D., Lou D., Häring M., Sharma N., Okawa S., Del Sol A., Adameyko I., Svensson M., Persson O., Ernfors P. // *Sci. Adv.* 2022. V. 8. P. eabm6340. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abm6340>
3. Ostrom Q.T., Gittleman H., Truitt G., Boscia A., Kruchko C., Barnholtz-Sloan J.S. // *Neuro Oncol.* 2018. V. 20. P. iv1–iv86. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy131>
4. Tan A.C., Ashley D.M., López G.Y., Malinjak M., Friedman H.S., Khasraw M. // *CA Cancer J. Clin.* 2020.

- V. 70. P. 299–312.
<https://doi.org/10.3322/caac.21613>
5. Schuller H.M. // Nat. Rev. Cancer. 2009. V. 9. P. 195–205.
<https://doi.org/10.1038/nrc2590>
6. Egleton R.D., Brown K.C., Dasgupta P. // Trends Pharmacol. Sci. 2008. V. 29. P. 151–158.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.12.006>
7. Zoli M., Pucci S., Vilella A., Gotti C. // Curr. Neuropharmacol. 2018. V. 16. P. 338–349.
<https://doi.org/10.2174/1570159X156666170912110450>
8. Wessler I., Kirkpatrick C.J. // Br. J. Pharmacol. 2008. V. 154. P. 1558–1571.
<https://doi.org/10.1038/bjp.2008.185>
9. Grando S.A. // Nat. Rev. Cancer. 2014. V. 14. P. 419–429.
<https://doi.org/10.1038/nrc3725>
10. Tsurutani J., Castillo S.S., Brognard J., Granville C.A., Zhang C., Gills J.J., Sayyah J., Dennis P.A. // Carcinogenesis. 2005. V. 26. P. 1182–1195.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgi072>
11. Dasgupta P. // J. Clin. Invest. 2006. V. 116. P. 2208–2217.
<https://doi.org/10.1172/JCI28164>
12. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Jolkovsky D.L., Pinkerton K.E., Grando S.A. // FASEB J. 2007. V. 22. P. 1356–1368.
<https://doi.org/10.1096/fj.07-9965com>
13. Wang S., Hu Y. // Oncol. Lett. 2018. V. 16. P. 1375–1382.
<https://doi.org/10.3892/ol.2018.8841>
14. Shulepko M.A., Bychkov M.L., Lyukmanova E.N., Kirpichnikov M.P. // Dokl. Biochem. Biophys. 2020. V. 493. P. 211–214.
<https://doi.org/10.1134/S1607672920040134>
15. Loughner C.L., Bruford E.A., McAndrews M.S., Delp E.E., Swamynathan S., Swamynathan S.K. // Hum. Genomics. 2016. V. 10. P. 10.
<https://doi.org/10.1186/s40246-016-0074-2>
16. Vasilyeva N.A., Loktyushov E.V., Bychkov M.L., Shenkarev Z.O., Lyukmanova E.N. // Biochemistry (Moscow). 2017. V. 82. P. 1702–1715.
<https://doi.org/10.1134/S0006297917130090>
17. Shulepko M.A., Kulbatskii D.S., Bychkov M.L., Lyukmanova E.N. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 66–75.
<https://doi.org/10.1134/S1068162019020122>
18. Liu J.-F., Mao L., Bu L.-L., Ma S.-R., Huang C.-F., Zhang W.-F., Sun Z.-J. // Am. J. Cancer Res. 2015. V. 5. P. 3505–3515.
19. Jacobsen B., Kriegbaum M.C., Santoni-Rugiu E., Ploug M. // World J. Clin. Oncol. 2014. V. 5. P. 621–632.
<https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i4.621>
20. Choi S.H., Kong H.K., Park S.Y., Park J.H. // Int. J. Oncol. 2009. V. 35. P. 601–607.
https://doi.org/10.3892/ijo_00000371
21. Su S.-C., Lin C.-W., Yang W.-E., Fan W.-L., Yang S.-F. // Expert Opin. Ther. Targets. 2016. V. 20. P. 551–566.
<https://doi.org/10.1517/14728222.2016.1113260>
22. Fu X.W., Song P.F., Spindel E.R. // Int. Immunopharmacol. 2015. V. 29. P. 93–98.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.05.022>
23. Reiter R.E., Gu Z., Watabe T., Thomas G., Szigeti K., Davis E., Wahl M., Nisitani S., Yamashiro J., Le Beau M.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 1735–1740.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1735>
24. Bergqvist C., Kadara H., Hamie L., Nemer G., Safi R., Karouni M., Marrouche N., Abbas O., Hasbani D.J., Kibbi A.G. // Int. J. Dermatol. 2018. V. 57. P. 162–170.
<https://doi.org/10.1111/ijd.13850>
25. Russo P., Cardinale A., Margaritora S., Cesario A. // Life Sci. 2012. V. 91. P. 1087–1092.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.05.003>
26. Throm V.M., Männle D., Giese T., Bauer A.S., Gaida M.M., Kopitz J., Bruckner T., Plaschke K., Grekova S.P., Felix K. // Oncotarget. 2018. V. 9. P. 11734–11751.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.24312>
27. Luo L., McGarvey P., Madhavan S., Kumar R., Gusev Y., Upadhyay G. // Oncotarget. 2016. V. 7. P. 11165–11193.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.7163>
28. Chernyavsky A.I., Arredondo J., Galitovskiy V., Qian J., Grando S.A. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2010. V. 299. P. 903–911.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00216.2010>
29. Pettersson A., Nylund G., Khorram-Manesh A., Nordgren S., Delbro D.S. // Auton. Neurosci. 2009. V. 148. P. 97–100.
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2009.03.002>
30. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Grando S.A. // Life Sci. 2007. V. 80. P. 2243–2247.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.01.003>
31. Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Kudryavtsev D.S., Bychkov M.L., Kulbatskii D.S., Kasheverov I.E., Astapova M.V., Feofanov A.V., Thomsen M.S., Mikkelsen J.D., Shenkarev Z.O., Tselin V.I., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // PLoS One. 2016. V. 11. e0149733.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149733>
32. Lyukmanova E.N., Bychkov M.L., Sharonov G.V., Efrementko A.V., Shulepko M.A., Kulbatskii D.S., Shenkarev Z.O., Feofanov A.V., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // Br. J. Pharmacol. 2018. V. 175. P. 1973–1986.
<https://doi.org/10.1111/bph.14194>
33. Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Bychkov M.L., Shenkarev Z.O., Paramonov A.S., Chugunov A.O., Arseniev A.S., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // Acta Naturae. 2014. V. 6. P. 60–66.
34. Shulepko M.A., Bychkov M.L., Shlepova O.V., Shenkarev Z.O., Kirpichnikov M.P., Lyukmanova E.N. // Int. Immunopharmacol. 2020. V. 82. P. 106303.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106303>
35. Bychkov M.L., Shulepko M.A., Shlepova O.V., Kulbatskii D.S., Chulina I.A., Paramonov A.S., Baidakova L.K., Azev V.N., Koshelev S.G., Kirpichnikov M.P., Shenkarev Z.O., Lyukmanova E.N. // Front. Cell Dev. Biol. 2021. V. 9. P. 739391.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.739391>
36. Chernyavsky A.I., Shechetin I.B., Grando S.A. // Int. Immunopharmacol. 2015. V. 29. P. 36–44.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.05.033>

37. Kirichenko A.V., Shlepova O.V., Bychkov M.L., Mikhaylova I.N., Shulepko M.A., Lyukmanova E.N. // *J. Invest. Dermatol.* 2021. V. 141. P. 9.
<https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.02.065>
38. Thompson E.G., Sontheimer H. // *Cells.* 2019. V. 8. P. 1203.
<https://doi.org/10.3390/cells8101203>
39. Kajstura M., Halicka H.D., Pryjma J., Darzynkiewicz Z. // *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 2007. V. 71. P. 125–131.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.20357>
40. Bychkov M.L., Shenkarev Z.O., Shulepko M.A., Shlepova O.V., Kirpichnikov M.P., Lyukmanova E.N. // *PLoS One.* 2019. V. 14. P. e0217339.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217339>
41. Grave N., Scheffel T.B., Cruz F.F., Rockenbach L., Goertert M.I., Laufer S., Morrone F.B. // *Front. Pharmacol.* 2022. V. 13. P. 975197.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.975197>
42. Chen D., Zuo D., Luan C., Liu M., Na M., Ran L., Sun Y., Persson A., Englund E., Salford L.G. // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. e87281.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087281>
43. Zhang Z.-Q., Wang X., Xue B.-H., Zhao Y., Xie F., Wang S.-D., Xue C., Wang Y., Zhang Y.-S., Qian L.-J. // *Oncol. Rep.* 2021. V. 46. P. 202.
<https://doi.org/10.3892/or.2021.8153>
44. Pucci S., Fasoli F., Moretti M., Benfante R., Di Lascio S., Viani P., Daga, A., Gordon T.J., McIntosh M., Zoli M. // *Pharmacol. Res.* 2021. V. 163. P. 105336.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105336>
45. McConnell D.D., Carr S.B., Litofsky N.S. // *Expert Rev. Neurother.* 2019. V. 19. P. 545–555.
<https://doi.org/10.1080/14737175.2019.1617701>
46. Schildge S., Bohrer C., Beck K., Schachtrup C. // *J. Vis. Exp.* 2013. P. e50079.
<https://doi.org/10.3791/50079>
47. Shulepko M.A., Lyukmanova E.N., Paramonov A.S., Lobas A., Shenkarev Z.O., Kasheverov I.E., Dolgikh D.A., Tsetlin V.I., Arseniev A.S., Kirpichnikov M.P. // *Biochemistry (Moscow).* 2013. V. 78. P. 204–211.
<https://doi.org/10.1134/S0006297913020090>

Recombinant SLURP-1 Inhibits Growth and Migration of U251 MG Glioma by Cell Cycle Arrest and Modulation of MAPK and AKT Signaling Pathways

M. A. Shulepko*, **, M. L. Bychkov**, M. P. Kirpichnikov**, ***, and E. N. Lyukmanova*, **, ***,#

#Phone: +7 (495) 336-80-11; e-mail: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

*Shenzhen MSU-BIT University, International University Park Road 1, Dayun New Town, Longgang District, Shenzhen, Guangdong Province, 518172 PRC

**Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

***Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow University “Molecular Technologies of the Living Systems and Synthetic Biology”, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

A recombinant analog of the human SLURP-1 protein (rSLURP-1) effectively inhibits the growth of carcinomas by interaction with the $\alpha 7$ -type nicotinic acetylcholine receptor. Recently, rSLURP-1 inhibition of gliomas growth *in vitro* was shown by the authors, although, the mechanism of rSLURP-1 action was not studied. Here, we showed that rSLURP-1 selectively inhibits the growth of U251 MG glioma cells but not of normal astrocytes, and controls glioma cell migration. In addition, rSLURP-1 induces cell cycle arrest in the G2/M phase in U251 MG glioma cells, but does not result in apoptosis. Incubation of U251 MG cells with rSLURP-1 causes inhibition of phosphorylation of ERK, p38 MAPK, and AKT kinases, the activation of which contributes to the progression of gliomas. At the same time, rSLURP-1 does not affect the activity of JNK kinase. Thus, rSLURP-1 is an endogenous protein promising for the development of drugs based on it for the treatment of not only carcinomas, but also gliomas.

Keywords: SLURP-1, Ly6/uPAR, nicotinic acetylcholine receptor, glioma